

Gewässerbelastung mit endokrin wirksamen Substanzen: Untersuchungen zu Einflüssen auf die Reproduktions- biologie von *Xenopus laevis*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Gregor Levy
geboren am 22. April 1973 in Rastatt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Werner Kloas
2. Prof. Dr. Andreas Elepfandt
3. Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2005

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Reproduktionsbiologie von aquatischen Lebewesen durch die Gewässerbelastung mit endokrin wirksamen Substanzen (endocrine disruptors, ED) beeinflusst wird. Mit dem Amphib *Xenopus laevis* steht ein etabliertes Studienmodell zur Untersuchung der Wirkungen von ED auf die Reproduktionsbiologie zur Verfügung, das für die vorliegenden Studien modifiziert und erweitert sowie mit gewässeranalytischen Methoden verknüpft wurde.

Die Gefährdung wasserlebender Tiere durch Gewässerbelastung mit ED kann erfasst werden, indem die Wirkung einer ausgewählten Einzelsubstanz auf die Reproduktionsbiologie untersucht wird. Anschließend erfolgt ein Nachweis der Substanz in Umweltproben. Durch Expositionsversuche, histologische Untersuchungen und Expressionsnachweis eines molekularen östrogenen Biomarkers konnte festgestellt werden, dass Bisphenol A (BPA) in Kaulquappen von *Xenopus laevis* verweiblichend wirkt und seine Effekte über eine Bindung an den Östrogenrezeptor vermittelt. Chemische Analysen während der Expositionsversuche zeigten, dass BPA von den Kaulquappen aufgenommen wird und dass eine geringe Abbaubarkeit der Substanz während eines Zeitraums von 48 Stunden besteht. Die Analyse von BPA in Wasserproben, die aus dem Fluss Alb oder aus Kläranlagenausläufen stammten, zeigte, dass BPA im Gewässer in relevanten Konzentrationen vorhanden ist und hauptsächlich durch eine Kläranlage in den Fluss eingeleitet wird.

In einem Gewässer liegt allerdings ein Gemisch aus unterschiedlichen ED mit verschiedenen Wirkmechanismen vor. Die Gewässerbelastung mit endokrin wirksamen Substanzen kann weiterhin untersucht werden, indem Gewässerextrakte fraktioniert und in *in vitro*-Screeningmethoden getestet werden. Als Screeningmethoden dienten Rezeptorbindungsstudien an Östrogen- und Androgenrezeptoren sowie die Behandlung von Leberzellkulturen mit den Gewässerextrakten aus der Alb, um eine Regulation der Expression bestimmter Biomarkergene durch potenzielle ED nachzuweisen. Dazu wurde als neuer (anti)androgener und (anti)östrogener Biomarker das Retinol-binding Protein eingeführt. Die Untersuchung der Gewässerextrakte mit diesen Methoden zeigte, dass die Alb eine Belastung mit endokrin wirksamen Substanzen aufweist und dass hauptsächlich östrogen wirksame Substanzen vorkommen. Die Proben aus den Kläranlagenausläufen weisen die höchste endokrine Aktivität auf.

Schlagwörter

Gewässerbelastung, endocrine disruptors, *Xenopus laevis*, Bisphenol A, Retinol-binding Protein

Abstract

The present study examined the influence of endocrine active compounds (endocrine disruptors, ED), which are present in surface waters, on reproductive biology of aquatic organisms. The amphibian *Xenopus laevis* is a well-established model organism for the study of effects of ED on reproduction. It has been modified and broadened for the purpose of this study, and it was combined with chemical methods for water analyses.

It is possible to assess water pollution with ED by detecting effects on reproductive biology of one particular substance, and then by looking for this substance in environmental water samples. We showed the feminizing potency of Bisphenol A (BPA) in conducting exposure experiments with tadpoles, in examining histological samples of gonads and in detecting the induction of the expression of a molecular estrogenic biomarker. BPA was recognized to mediate its effects via binding to the estrogen receptor. Moreover, analysis of BPA during exposure experiments revealed that BPA is taken up by tadpoles and is not readily degradable during a time period of 48 hours. Chemical analyses of environmental water samples from the river Alb or samples from sewage treatment works (STW) showed that BPA is released into the environment by STW effluents.

In surface waters, there are different kinds of ED with different modes of action. Thus, it is another possibility to assess water pollution with ED by fractionating environmental water samples and by testing these fractions in rapid *in vitro*-screening methods. In the present work, receptor binding assays were carried out, both examining the binding to estrogen and androgen receptors. Furthermore, *Xenopus laevis* hepatocyte cultures were treated with fractions of environmental samples and biomarker expression was detected. A new biomarker to assess (anti)androgenic or (anti)estrogenic modes of action, respectively, was established. This new biomarker was the Retinol-binding Protein. The results obtained by these methods revealed that the river Alb is mainly polluted with estrogenic ED. Samples from STW effluents possessed the highest endocrine activity.

Keywords

Surface water pollution, endocrine disruptors, *Xenopus laevis*, Bisphenol A, Retinol-binding Protein

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	9
1.1	Endocrine disruptors (ED)	9
1.2	Störungen des endokrinen Systems durch ED	9
1.3	Endokrin wirksame Substanzen in der Umwelt	13
1.4	Amphibien als Studienmodelle	15
1.5	Ziele der Arbeit	17
2	Material & Methoden	20
2.1	Versuchstiere	20
2.1.1	Herkunft und Haltung der Versuchstiere	20
2.1.2	Zucht der Versuchstiere	20
2.2	Charakterisierung der östrogenen Wirkung von Bisphenol A <i>in vivo</i>	21
2.2.1	Exposition von Kaulquappen während der Larvalentwicklung	21
2.2.2	Geschlechtsbestimmung der juvenilen Frösche	23
2.2.3	Histologische Untersuchung der Gonaden	24
2.2.4	Kurzzeitige Kaulquappenexposition mit BPA und Bestimmung der ER-mRNA-Expression	25
2.2.4.1	Kurzzeitige Exposition der Kaulquappen mit BPA	26
2.2.4.2	RNA-Isolierung	26
2.2.4.3	Reverse Transkription (RT)	27
2.2.4.4	Polymerase Chain Reaction (PCR)	28
2.2.4.5	Darstellung der PCR-Produkte	29
2.2.5	Chemische Analyse von BPA in den Expositionsversuchen	30
2.3	Gewässeruntersuchungen	32
2.3.1	Charakterisierung des Untersuchungsflusses	32
2.3.2	Entnahme der Gewässerproben	34
2.3.3	Extraktion der Gewässerproben	35
2.3.4	Fraktionierung der Gewässerextrakte	36
2.3.5	Analyse der Gewässerproben	36

2.4 Bioassays zur Untersuchung der Gewässerextrakte.....	37
2.4.1 Rezeptorbindungsstudien.....	37
2.4.2 Induktion der Expression von Biomarkergenen durch Be- handlung von primären Leberzellkulturen	40
2.4.2.1 Herstellung der Zellkulturen	40
2.4.2.2 Behandlung der Zellkulturen	43
2.4.2.3 Aufarbeitung der behandelten Hepatocyten	45
2.5 Statistik	47
3 Ergebnisse	48
3.1 In vivo-Exposition von Kaulquappen.....	48
3.1.1 Wirkungen von BPA auf die Sexualdifferenzierung von <i>Xe- nopus laevis</i>	48
3.1.2 Wirkungen von BPA auf die Gonadenentwicklung	52
3.1.3 Nachweis der ER-mRNA-Expression in Kaulquappen nach kurzzeitiger Behandlung mit BPA	54
3.1.4 Nachweis von BPA in den Expositionsversuchen	56
3.1.5 Nachweis von BPA in Umweltproben	60
3.2 Endokrin wirksame Substanzen in Gewässerproben	63
3.2.1 Rezeptorbindungsstudien mit Gewässerextrakten	63
3.2.2 Behandlung von Leberzellkulturen mit Gewässerextrakten	66
3.2.3 Das Retinol-binding Protein als Biomarker	66
3.2.4 Biomarkerexpression in Leberzellkulturen nach Behandlung mit Gewässerproben	72
3.3 Nachweis ausgewählter endokrin wirksamer Stoffe in der Alb 	80
4 Diskussion	82
4.1 Umweltbelastung mit ED – Einzelstoffansatz	83
4.1.1 In vivo-Labormethoden zur Untersuchung der Wirkungen von ED.....	83
4.1.2 Amphibien als Modellorganismen zur Untersuchung von ED	84
4.1.3 Einfluss von BPA auf die Sexualentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	86

4.1.4 Chemische Analyse von BPA in den Expositionsversuchen und in Gewässerproben	90
4.2 Umweltbelastung mit ED – Gemischansatz	92
4.2.1 ED in der Umwelt als komplexes Gemisch von Stoffen mit verschiedenen Wirkmechanismen.....	92
4.2.2 Untersuchungen der Gewässerproben mit ausgewählten Bio assays	93
4.2.2.1 Rezeptorbindungsstudien mit Albextrakten	94
4.2.2.2 Etablierung von RBP-mRNA als Biomarker	96
4.2.2.3 Biomarkerexpression in Leberzellkulturen nach Behandlung mit Gewässerextrakten der Alb	99
4.3 Bewertung der ED-Belastung der Alb	101
4.4 Vergleich der Untersuchungen von Einzelstoff- und Ge- mischansatz	105
4.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	106
5 Literatur	109
6 Danksagung	118
Anhang.....	119
Liste der Veröffentlichungen	119

1 EINLEITUNG

1.1 ENDOCRINE DISRUPTORS (ED)

Es gibt Substanzen natürlichen und anthropogenen Ursprungs, die über das endokrine System unerwünschte hormonphysiologische Folgereaktionen in Lebewesen auslösen können. Diese Substanzen werden unter anderem als „endocrine disruptors“ (ED) bezeichnet. ED sind nach der beim Weybridge Workshop der EU 1996 gefassten Definition „exogene Substanzen, die als Folge der Veränderung der endokrinen Funktionen entgegengesetzte (adverse) Gesundheitseffekte in einem intakten Organismus oder seiner Nachkommenschaft verursachen“ (EUROPEAN COMMISSION 1996).

Die größte Aufmerksamkeit erlangten diejenigen Chemikalien, die in die hormonelle Steuerung der Fortpflanzung eingreifen können, denn die meisten dieser Substanzen vermitteln oder blockieren die Wirkungen der Sexualsteroiden. Es handelt sich zumeist um lipophile Chemikalien, die ähnliche Wirkungen wie die natürlichen weiblichen Sexualhormone induzieren können und die deswegen als Xenoöstrogene bezeichnet werden (COLBORN & CLEMENT 1992; COLBORN ET AL. 1993). Die auftretenden Phänomene, die ursächlich mit den Xenoöstrogenen zusammenhängen, werden unter dem Begriff „Verweiblichung“ zusammengefasst.

Die Erforschung der Wirkungen von exogenen (Xeno)östrogenen ließ synthetische oder natürliche Substanzen unberücksichtigt, die als Antiöstrogene, Androgene oder Antiandrogene wirken können (SONNENSCHNITT & SOTO 1998; VOS ET AL. 2000). Dabei können antiandrogene ED ebenfalls zur Verweiblichung, antiöstrogene zur Entweiblichung bzw. Neutralisierung und androgene zur Vermännlichung führen (KLOAS 2002). Wie ED mit dem endokrinen System interagieren, zeigt das folgende Kapitel.

1.2 STÖRUNGEN DES ENDOKRINEN SYSTEMS DURCH ED

Das endokrine System gehört neben dem Immunsystem und dem Nervensystem zu den Kommunikationssystemen des Körpers. Seine Aufgabe besteht darin, durch Regulierung bestimmter physiologischer Vorgänge (z.B. Osmoregulation, Entwicklung oder Reproduktion) die Körperhomöostase ei-

nes Organismus aufrecht zu halten. Dazu verwendet es chemische Botenstoffe, die Hormone. Diese lassen sich grundsätzlich in zwei Klassen einteilen, nämlich in lipophile und in hydrophile Hormone. Zu den lipophilen Hormonen zählen Steroide und Schilddrüsenhormone, zu den hydrophilen Catecholamine und Peptidhormone (NORRIS 1997). Beide Gruppen unterscheiden sich grundsätzlich in der Art der Vermittlung ihrer Wirkung: Hydrophile Hormone binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Zielzelle und setzen damit eine Signaltransduktionskette in Gang, die in relativ kurzfristigen Zustandsänderungen der Zelle mündet (z.B. Beeinflussung von Ionenkanälen, Aktivierung intrazellulärer Enzyme, etc.). Die lipophilen Hormone vermitteln ihre Wirkung über eine Bindung an intrazelluläre Rezeptoren, wodurch eine differenzierte Beeinflussung der Genexpression stattfindet. Viele der bekannten ED, die einen Einfluss auf die Reproduktionsbiologie haben, wirken auf eine ähnliche Weise wie die Sexualsteroidhormone. Deswegen wird auf die Regulations- und Wirkmechanismen der Steroidhormone im Folgenden näher eingegangen.

Die Bildung und Ausschüttung der Sexualsteroidhormone unterliegen den negativen Rückkopplungsmechanismen (Feedback-Regulation) eines hierarchisch gegliederten Systems. Ein typisches Beispiel dafür ist die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (**Abb. 1-1**). Im Zentralnervensystem wird in den Zellen des Hypothalamus das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) gebildet. GnRH regt bestimmte Zellen der Hypophyse zur Abgabe der Gonadotropine (Luteinisierendes Hormon (LH) bzw. Follikelstimulierendes Hormon (FSH)) an. Diese werden in den Blutkreislauf abgegeben. Bei weiblichen Tieren induzieren sie in den Follikelzellen des Ovars die Bildung von 17β -Östradiol (E2). Zu diesem Zweck wird hauptsächlich in den Thekazellen gebildetes Testosteron (T) in den benachbarten Granulosa-zellen durch das Enzym Aromatase in E2 umgewandelt. E2 wird freigesetzt und die erhöhte E2-Konzentration im Blut bewirkt im Hypothalamus und in der Hypophyse über eine negative Rückkopplung, dass die Sekretion von GnRH und LH bzw. FSH vermindert wird. Im Blutkreislauf wird E2 auf Grund seiner Lipophilie zu 90 – 95 % an Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) gebunden und zu den Zielorganen transportiert. Bei den Wirbeltieren ist ein Hauptzielorgan von E2 die Leber. E2 dissoziiert vom SHBG ab und diffundiert durch die Zellmembran der Hepatocyte. Im Cytoplasma bindet E2 an den Östrogenrezeptor (ER). In der Leber kann E2 auch durch Metabolisierungsprozesse in eine wasserlösliche Form überführt und dann über die Niere als Glukuronid oder Sulfatester ausgeschieden werden.

Bei männlichen Tieren führen FSH und LH in den interstitiellen (Leydig-schen) Zellen der Hoden zur Produktion der Androgene. Die Androgene binden an das gleiche SHBG wie E2 und auch die Vermittlung der Androgenwir-

kung in den Zielzellen erfolgt analog den Östrogenen über cytosolische Rezeptoren und entsprechende Beeinflussung der Genexpression.

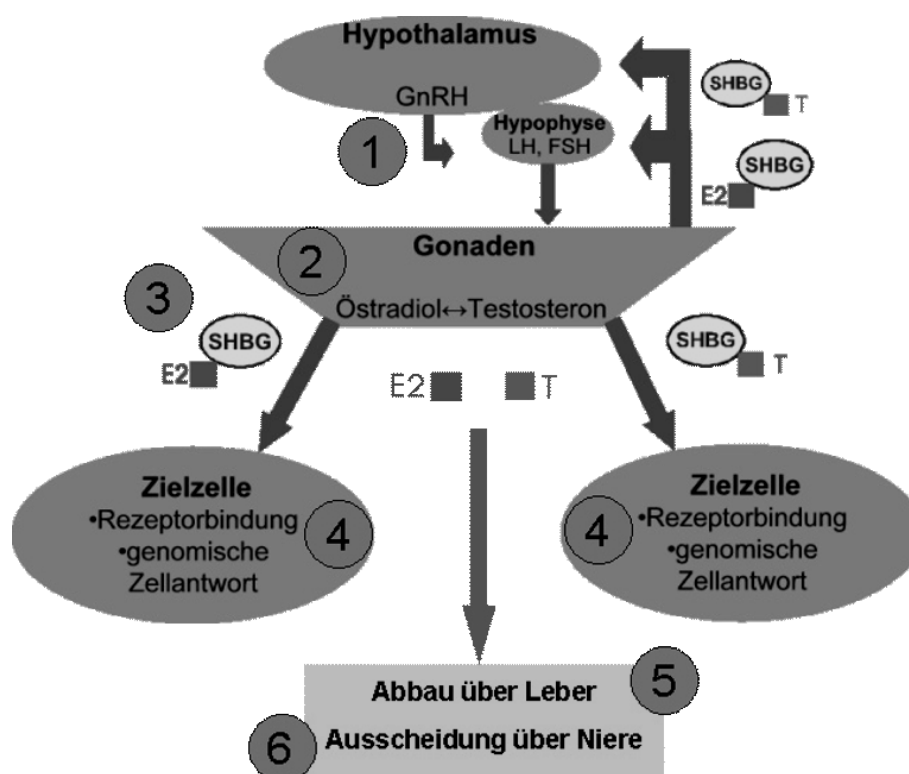


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und der möglichen Angriffspunkte für ED. GnRH: Gonadotropin-releasing Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, FSH: Follikel-stimulierendes Hormon, SHBG: Sexualhormon-bindendes Globulin, E2: 17 β -Östradiol, T: Testosteron, 1-6: mögliche Angriffspunkte der ED, Erläuterungen im Text.

Die beschriebenen Zusammenhänge verdeutlichen die vielfältigen Möglichkeiten der körperfremden endokrin wirksamen Substanzen, in die hormonelle Regulation einzugreifen. In **Abb. 1-1** sind die wichtigsten Angriffspunkte dargestellt: Es besteht zum Beispiel die Möglichkeit, die Regulation über Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse zu stören (1). Änderungen der Aktivität steroidproduzierender Enzyme in den Gonaden (2) und Störungen der Funktion der steroidbindenden Moleküle (3) stellen weitere Eingriffsmöglichkeiten für ED dar. Es können weiterhin Veränderungen der Aktivität der Hormonrezeptoren durch agonistische oder antagonistische Bindung der ED verursacht werden (4) und schließlich können die hormonabbauende Leberaktivität (5) und die Ausscheidungsprozesse über die Niere (6) beeinflusst werden (GUNDERSON ET AL. 2001).

Die Bindung an den Hormonrezeptor führt dazu, dass ED die Genexpression beeinflussen können. Damit ist dieser Vorgang derjenige, der die unmittelbarste Wirkung im Organismus hervorruft, indem bestimmte Merkmalsausprägungen verstärkt oder gehemmt werden. Die molekularen Prozesse in der Zielzelle, die bei einer Bindung von Hormonen oder von ED an die entsprechenden Hormonrezeptoren stattfinden, werden im Folgenden beschrieben.

Der ER und der Androgenrezeptor (AR) gehören zur Superfamilie der Kernrezeptoren. Kernrezeptoren sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren mit charakteristischen Strukturen. Sie besitzen eine variable N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine konservative DNA-Bindungsdomäne und eine variable C-terminale Ligandenbindungsdomäne. Diese generelle Struktur entwickelte sich in verschiedenen Kernrezeptorfamilien, die sich mit unterschiedlichen Liganden, wie z.B. Vitamin A (Retinol), Steroid- und Schilddrüsenhormonen, verbinden können. Zusätzlich sind eine Fülle von Wechselwirkungen zwischen den Liganden, den Rezeptoren und anderen zellspezifischen Faktoren (sogenannte Kofaktoren) bekannt (HARRIS ET AL. 2002). Inzwischen wurden neue Rezeptor-Unterformen und Isorezeptoren gefunden. Ein prominentes Beispiel sind die beiden Unterformen des ER, ER α und ER β . Offensichtlich reicht eine einzige Hormonrezeptorform nicht aus, die ganze Bandbreite hormonphysiologischer Antworten alleine zu vermitteln. Die unterschiedliche Verteilung und Aktivität der Rezeptor-Unterformen in einem Organismus erlauben es bestimmten Liganden, gewebs- oder zellspezifische Wirkungen zu entfalten. Zusätzlich zeigen einige Rezeptor-Unterformen unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber dem spezifischen Hormon. Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Vermutung, dass ligandenbedingte Selektivität zur Kontrolle der Hormonantworten durch die Kernrezeptoren beiträgt (SPERRY & THOMAS 1999).

Im inaktiven Ausgangszustand bilden ER und AR mit Heat-Shock-Proteinen einen Komplex. Die Bindung von E2 an den ER bzw. von T an den AR führt zum Abdissoziieren dieser Proteine. Dadurch werden die Rezeptoren aktiviert und der Hormon-Rezeptor-Komplex wird in den Zellkern transportiert. Bevor die Bindung an die entsprechenden DNA-Bindungsstellen stattfindet, erfolgt eine Homodimerisierung zweier Rezeptorproteine. Das Rezeptor-Homodimer bindet an ein hormonresponsives Element (HRE), das üblicherweise aus zwei palindromischen Sequenzen innerhalb der Promotorregion steroidhormonregulierter Gene besteht. Der Hormon-Rezeptor-Komplex geht dann mit weiteren Transkriptionsfaktoren eine Verbindung ein und reguliert dadurch die Aktivität der RNA-Polymerase (**Abb. 1-2**). Als Folge lassen sich Hemmungen oder Verstärkungen der Expression von Genen be-

obachten, die bestimmte biologische Wirkungen hervorrufen (HIORT & HOLTERHUS 2000).

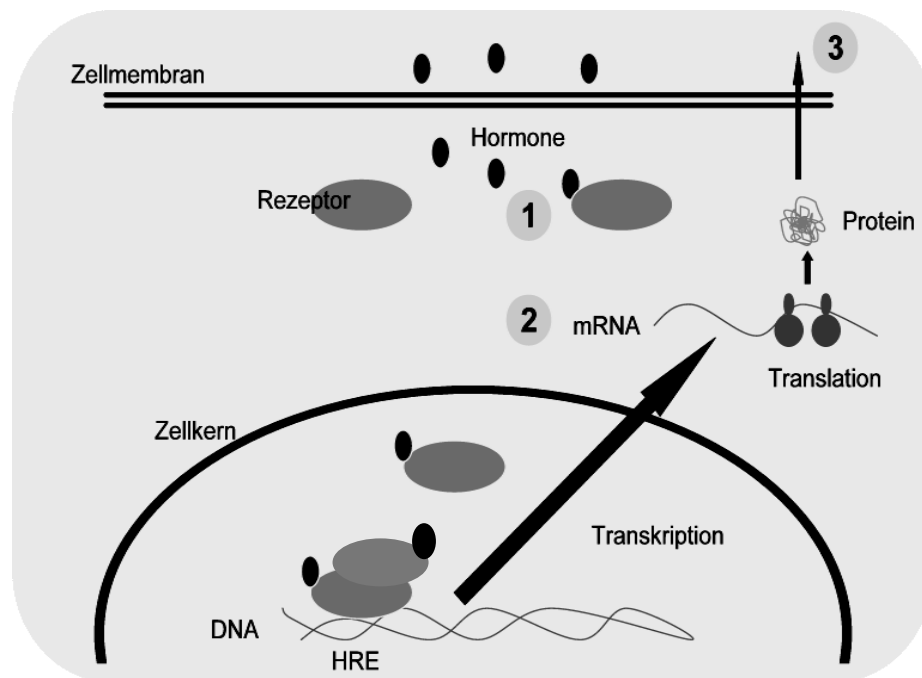


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der hormoninduzierten genomischen Zellantwort. Die Zahlen 1-3 dokumentieren die möglichen Nachweisebenen bei der Untersuchung potenzieller ED. 1. Nachweis der Bindung von ED an Hormonrezeptoren. 2. Nachweis der durch ED induzierten oder gehemmten mRNA-Synthese. 3. Nachweis der veränderten Merkmalsausprägung durch ED. DNA: Desoxyribonukleinsäure, HRE: hormonresponsives Element, mRNA: messenger Ribonukleinsäure.

1.3 ENDOKRIN WIRKSAME SUBSTANZEN IN DER UMWELT

Laborstudien mit Einzelsubstanzen in standardisierten Bioassays geben Hinweise darauf, ob diese Substanzen als ED wirken können bzw. welche der im vorherigen Kapitel genannten Möglichkeiten der Störung des endokrinen Systems vorliegen. Aber weder die Untersuchung von Einzelsubstanzen noch die Verwendung einzelner Testorganismen repräsentieren die tatsächliche Situation in der Umwelt. Dort liegt immer ein Gemisch hormonaktiver

Substanzen vor und unterschiedliche Organismen können betroffen sein. Diese haben bestimmte Voraussetzungen, um auf die Belastung zu reagieren, da sie über verschiedene Abbau- oder Ausscheidungsmechanismen verfügen, mit denen sie die potenziellen ED unwirksam machen können. Infolgedessen ist die tatsächliche Gefährdung für Menschen und Ökosysteme durch ED erst abschätzbar, wenn sowohl die Wirkmechanismen des Stressors als auch seine entsprechenden Einflüsse auf Organismen und Populationen bekannt sind (KLOAS 2002).

Anthropogen bedingte Umweltverschmutzung beeinträchtigt die Lebensvorgänge und kann im extremsten Fall zum Tod von Lebewesen führen. Eine Kategorie umweltbelastender Stoffe umfasst die bereits eingeführten endokrin wirksamen Substanzen. ED wurden in den entferntesten Gegenden der Erde gefunden. Aufgrund ihrer geringen Größe (nm bis μm) und ihrer relativen Persistenz gelangen sie mit Hilfe von Wind- und Meeresströmungen an entlegenste Orte wie Arktis oder Antarktis. Dort können sie sich ansammeln, obwohl der Ort ihrer Freisetzung weit entfernt liegt. Außerdem wurden ED in sämtlichen Komponenten der Biosphäre gefunden, nämlich im Boden, im Wasser, in der Luft und in den Lebewesen selbst (COLBORN ET AL. 1996). Im Rahmen dieser Arbeit war es erforderlich, sich auf die Betrachtung der Situation in Oberflächengewässern zu beschränken.

Oberflächengewässer dienen als Senke für ED (JOBLING & SUMPTER 1993; KLOAS ET AL. 2000). Kommunales und industrielles Kläranlagenauslaufwasser kann den Vorfluter mit zahlreichen Schadstoffen verunreinigen. Dazu gehören Xenoöstrogene und natürliche Östrogene, pharmazeutische Wirkstoffkomponenten, polyaromatische Kohlenwasserstoffe, Pestizide und Schwermetalle. Diese Verunreinigungen stammen aus Haushaltschemikalien, Medikamenten sowie Industriechemikalien und deren Abbauprodukten. Weiterhin werden ED von landwirtschaftlichen Nutzflächen (z.B. Herbizidwirkstoffe) und aus Industrieanlagen ausgewaschen und in die Oberflächengewässer gespült. Diese Eintragsquellen sind flächenmäßig nicht klar abgrenzbar und somit quantitativ nur unzureichend zu erfassen. Anders verhält es sich mit den zuerst genannten Verunreinigungen durch Kläranlagenauslaufwasser, die als punktuelle Eintragsquellen bekannt, leicht zugänglich und quantifizierbar sind (SUMPTER 1997).

Der Abbau der ED in den Kläranlagen ist zumeist unvollständig und unzureichend, so dass sich bestimmte Substanzen im Auslaufwasser der Kläranlage in relevanten Konzentrationen feststellen lassen. So wiesen beispielsweise TOFT & BAATRUP (2001) im Auslaufwasser von Kläranlagen in Dänemark E2, das synthetische Östrogen Ethinylöstradiol (EE) und die östrogen wirksame Chemikalie Bisphenol A (BPA) jeweils in Konzentrationen von 0,2 – 0,6 ng / L, 0,4 – 2 ng / L und 20 – 700 ng / L nach. Diese Werte

lassen erkennen, dass die Leistungsfähigkeit der spurenanalytischen Methoden gestiegen ist. Dadurch erhöht sich auch die Zahl der entdeckten organischen Verbindungen in Oberflächengewässern und Kläranlagenausläufen. Die meisten Schadstoffe kommen in Konzentrationsbereichen von ng / L bis µg / L vor. Diese Konzentrationsbereiche liegen außerhalb der für aquatische Organismen akuten toxischen Konzentrationen, aber innerhalb der wirksamen Konzentrationen für Störungen ihres endokrinen Systems.

Die meisten Lebewesen in Gewässern sind wirbellose Tiere, bei denen ab dem Stamm der Coelenteraten schon Hormonsysteme vorhanden sind. Dennoch fokussiert sich die Forschung auf die Wirkungen von ED in Wirbeltieren und vernachlässigt die Wirbellosen, obwohl deren Lebenszyklen zum Teil intensiv der hormonellen Regulation unterliegen (z.B. Larvalstadien, Verpuppung, Metamorphose, Diapause, etc.). Ein Beispiel zur Schädigung von Wirbellosen in Oberflächengewässern ist die Süßwassermuschel *Elliptio complanata*. Es wurde gezeigt, dass Muscheln im Flusswasser unterhalb eines Kläranlagenauslaufs überdurchschnittlich viel Vitellogenin (Vg) produzierten (GAGNÉ ET AL. 2001). Vg ist ein Vorstufenprotein der Eidotterbildung in oviparen Lebewesen und wird häufig als östrogenen Biomarker verwendet, da seine Biosynthese durch weibliche Sexualhormone reguliert wird. Süßwassermuscheln und andere Invertebraten (z.B. Schnecken, vgl. OEHLMANN ET AL. 2000) stellen eine besondere Risikogruppe dar, da sie stationär leben bzw. geringe Mobilität zeigen und sich somit der Belastungssituation nicht entziehen können.

Niedere Wirbeltiere, die ihr Leben vollständig oder teilweise im Wasser verbringen, sind Fische und Amphibien. Aus beiden Wirbeltierklassen liegen Untersuchungen vor, die Wirkungen von ED auf die Reproduktionsbiologie sowohl in Laborversuchen als auch im Freiland zeigten (KIME 1998; OPITZ ET AL. 2002). In einem klassischen Experiment konnten PURDOM ET AL. (1994) nachweisen, dass männliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die im Auslaufwasser britischer Kläranlagen in Käfigen gehalten wurden, Verweiblichungserscheinungen aufwiesen. Diese äußerten sich in signifikant erhöhter Vg-Synthese in den männlichen Tieren. Seither wurden viele weitere Beispiele gefunden, die einen Einfluss verschiedener Einleiter in Oberflächengewässern auf die Reproduktionsbiologie vor allem von Fischen zeigten (zur Übersicht: TYLER ET AL. 1998; KLOAS 2002).

Bei im Meerwasser lebenden Säugetieren wurden Schädigungen entdeckt, die ebenfalls als Auswirkungen einer Belastung mit ED interpretiert wurden. Reduzierter Fortpflanzungserfolg, Tumorbildung in den Gonaden oder zwittrige Gonadenentwicklung wurden zum Beispiel bei Walen oder Seehunden gefunden (DE GUISE ET AL. 1995). Schädigungen von im Süßwasser lebenden Säugetieren wie Biber oder Otter durch ED sind nicht be-

kannt. Selbst Menschen können von der Belastung der Gewässer mit ED betroffen sein. Die Gefährdung besteht darin, dass Oberflächenwasser als Rohwasser zur Trinkwassergewinnung benutzt wird. Die Trinkwasseraufbereitung findet ohne Kontrolle des Wassers auf dessen Gehalt an ED statt.

1.4 AMPHIBIEN ALS STUDIENMODELLE

Amphibien sind aufgrund ihrer zumindest zum Teil aquatischen Lebensweise dazu geeignet, als Testorganismen zur Untersuchung der Gewässerbelastung mit ED zu dienen. Amphibien stellen bevorzugte Studienmodelle in der Endokrinologie und der Entwicklungsbiologie dar, sind in der ED-Forschung aber nicht weit verbreitet, obwohl auch Amphibien von den Umweltverschmutzungen mit ED betroffen sind. In den vergangenen Jahrzehnten wurde weltweit ein Rückgang der Amphibienpopulationen beobachtet (BLAUSTEIN & WAKE 1990). Neben zunehmender Belastung durch UV-Strahlung (BLAUSTEIN ET AL. 1994), Kontaminationen mit toxischen Stoffen und Habitatszerstörungen (CAREY 2000) stehen ED im Verdacht, einen Beitrag zum Amphibiensterben zu leisten (CAREY & BRYANT 1995).

Amphibien leben während der Larvalentwicklung aquatisch. Dadurch sind sie Schadstoffen im Gewässer kontinuierlich ausgesetzt. Der Laich weist, im Gegensatz zu allen anderen Anamniota, weder eine Schale noch eine Membran auf und die Kaulquappen besitzen eine hochpermeable Haut, so dass exogene Substanzen während der gesamten Embryonal- und Larvalentwicklung nahezu ungehindert in den Organismus gelangen können. Der Zeitraum bis zum Abschluss der Metamorphose stellt somit die sensitivste Phase gegenüber dem Einfluss exogener Faktoren und damit auch gegenüber dem Einfluss von ED bei Amphibien dar.

Die Geschlechtsdifferenzierung bei Amphibien unterliegt bei einigen Arten der Kontrolle der Geschlechtshormone. Die Verteilung der Geschlechter kann sich unabhängig vom Genotyp ändern, wenn während des Zeitraumes der Keimzellendifferenzierung eine Behandlung mit Sexualsteroiden erfolgt. Eine Behandlung mit Östrogenen erzeugt vermehrt weibliche Phänotypen, während die Gegenwart von Androgenen im Umgebungsmedium in dieser Entwicklungsphase zu mehr männlichen Phänotypen führen kann (WITSCHI & ALLISON 1950; WITSCHI 1971; GALLIEN 1974; HAYES 1998; WALLACE ET AL. 1999; BÖGI ET AL. 2002). Damit bieten Amphibien die Möglichkeit, den Einfluss von exogenen Substanzen auf die Sexualdifferenzierung *in vivo* zu untersuchen.

Als Studienmodell diente in der vorliegenden Arbeit der Südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* (DAUDIN). In unserer Arbeitsgruppe ist *Xenopus laevis* als Studienobjekt zur Untersuchung der Wirkungen von ED auf das Hormonsystem etabliert (KLOAS ET AL. 1999; LUTZ & KLOAS 1999; KLOAS 2002; OPITZ ET AL. 2002; BÖGI ET AL. 2002, 2003). Zum einen ermöglichen Rezeptorbindungsstudien die Untersuchung der Bindungsaffinität von ED an die cytosolischen Hormonrezeptoren von *X. laevis*. Zum anderen lässt sich die biologische Wirkung von ED durch Behandlung von primären Hepatocytenkulturen nachweisen, indem die ED-induzierte Transkription bestimmter Biomarkergene gemessen wird. Außerdem wurde ein *in vivo*-Testsystem entwickelt, das die Untersuchung der Wirkung von ED auf die Sexualdifferenzierung und der Metamorphose während der Larvalentwicklung ermöglicht (vgl. **Abb. 1-2**).

Xenopus laevis ist ein geeigneter Testorganismus sowohl für *in vitro*- als auch für *in vivo*-Experimente zur Detektion hormonähnlicher Wirkungen. Zusätzlich können die Tiere einfach gehalten werden und ganzjährig reproduzieren (DEUCHAR 1975; HILKEN ET AL. 1995). Die Entwicklung des Krallenfrosches vom befruchteten Ei bis zum juvenilen Frosch wurde mit Hilfe einer Normentafel in 66 Stadien unterteilt (NIEUWKOOP & FABER 1994). Die Angaben zu den Entwicklungsphasen in dieser Arbeit beziehen sich auf diese Stadieneinteilung.

1.5 ZIELE DER ARBEIT

Mit der vorliegenden Arbeit sollten die bisherigen Möglichkeiten der Untersuchung von ED mit dem Modellorganismus *Xenopus laevis* erweitert werden. Ein Schwerpunkt lag auf der Frage nach der Möglichkeit, durch eine Verbindung von Bioassays und Gewässeranalytik die Belastung eines Modellgewässers mit ED überprüfen zu können. Für dieses Vorhaben gibt es zwei prinzipielle Ansatzmöglichkeiten: Zum einen kann die gezielte gewässeranalytische Suche nach einer Einzelsubstanz in Kombination mit einer umfassenden Charakterisierung der Wirkungen dieser Substanz auf die Fortpflanzungsbiologie erfolgen. Zum anderen kann ein unbekanntes Stoffgemisch aus einer Umweltprobe in geeigneten Bioassays auf potenziell endokrin wirksame Inhaltsstoffe untersucht werden, um Wirkmechanismen und letztlich die dafür verantwortlichen Substanzen zu identifizieren. Beide Ansätze wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgt und diskutiert.

Der sogenannte Einzelstoffansatz befasste sich ausführlich mit der bekannten östrogen wirksamen Chemikalie Bisphenol A. BPA dient als Monomer zur Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen. Weiterhin wird es als Stabilisator in Polymerprodukten, als Antioxidans in der Reifenproduktion, als eine Basischemikalie für das übliche Löschmittel Tetrabromobisphenol A, als Zusatz in Thermopapier und Papierbeschichtungen und nicht zuletzt als Bestandteil von Kunststoffzahnfüllungen verwendet. Die Produktion betrug 1995 in Deutschland 210 000 t, was der Hälfte des jährlichen Bedarfs in Westeuropa entspricht (HEEMKEN ET AL. 2001).

Die Wirkungen von BPA auf die Reproduktionsbiologie von *Xenopus laevis* wurden intensiv untersucht. Dabei wurden sämtliche Organisationsebenen berücksichtigt, indem Effekte auf den sich entwickelnden Gesamtorganismus, Wirkungen auf die reproduktiven Organe, Effekte auf die Zellen der Gonaden und Wirkungen auf molekularer Ebene durch die *in vivo*-Induktion des Biomarkers ER untersucht wurden. Parallel wurde eine analytische Methode für einen quantitativen BPA-Nachweis entwickelt.

Zum anderen wurde die Frage gestellt, ob BPA in einem durchschnittlich anthropogen belasteten Gewässer nachweisbar ist und ob Gewässerextrakte entsprechende östrogene Wirkungen induzieren können. Als Untersuchungsgewässer wurde die Alb gewählt, ein Nebenfluss des Rheins bei Karlsruhe in Baden-Württemberg. Es musste zunächst die Methodik zur Extraktion und weitergehenden Fraktionierung der Wasserproben entwickelt werden, so dass schließlich ein BPA-Nachweis versucht werden konnte.

Die bisher überwiegend einseitige Erforschung der östrogenen Wirkungen von Umweltchemikalien berücksichtigt nicht die Tatsache, dass anthropogen belastete Oberflächengewässer immer eine Mischung verschiedenster Substanzen enthalten, die alle vier für die Reproduktionsbiologie relevanten Wirkmechanismen ((anti)östrogen, (anti)androgen) umfassen können. Diese Gegebenheit wurde im sogenannten Gemischansatz beachtet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Belastungssituation eines Gewässers dann eindeutig erfasst ist, wenn Identität, Quantität und Wirkung aller Wasserinhaltsstoffe ermittelt werden. Dies ist aufgrund der Vielfalt der Substanzen, möglichen Wirkungen und gewässerspezifischen Belastungssituationen praktisch nicht durchzuführen. Deswegen sollte mit der vorliegenden Arbeit ein Biomarker eingeführt werden, der als Summenparameter Hinweise auf mögliche (anti)androgene sowie (anti)östrogene Wirkungen geben kann. Dafür eignet sich das Retinol-bindende Protein (RBP), denn seine Synthese unterliegt der Regulation durch die männlichen und weiblichen Sexualsteroiden (McKEARIN ET AL. 1987).

Im Allgemeinen erfordert eine Untersuchung von Umweltbelastungen mit ED eine gewässeranalytische Begleituntersuchung des Studiengewäs-

sers. Dadurch lassen sich jedoch keine Aussagen über die biologische Wirksamkeit der analysierten Substanzen treffen. Dagegen erfassen Bioassays die Wirkungen, sind aber meist nicht in der Lage, Substanzidentifizierung und -quantifizierung zu gewährleisten. Eine Lösung des Problems besteht darin, eine Kombination analytischer und biologischer Testverfahren anzustreben (BURNISON ET AL. 1996; SUMPTER 1997). So kann zuerst eine Fraktionierung der Probe stattfinden und anschließend können Wirkungsstudien und chemische Analysen der bioaktiven Fraktionen durchgeführt werden. Dieser Ansatz wird TRE / TIE-Verfahren (Toxicity reduction evaluation / toxicity identification evaluation) genannt. Die Vorgehensweise zeichnet sich dadurch aus, dass aus einer heterogenen Ausgangsprobe Fraktionen hergestellt werden, die weniger heterogen zusammengesetzt sind. Dadurch werden nachfolgende analytische und biologische Verfahren vereinfacht.

Da, wie oben erwähnt, in Gewässern ein Gemisch von unterschiedlich wirksamen ED vorliegt, erfolgte die Etablierung eines weiteren Biomarkers, des RBP. Durch Behandlung von Zellkulturen mit Gewässerextrakten und anschließender RBP-mRNA- und ER-mRNA-Bestimmung konnten Aussagen zur Gesamtbelastung bestimmter Gewässerabschnitte gewonnen werden. Zusätzlich wurden die Gewässerextrakte in Rezeptorbindungsstudien mit dem ER und dem AR eingesetzt, um Rezeptorbindungsaffinitäten von Extraktinhaltsstoffen nachzuweisen.

Die aufgeführten Ziele, die mit vorliegender Arbeit erreicht werden sollten, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Charakterisierung der östrogenen Wirkung von BPA *in vivo*;
2. Entwicklung einer analytischen Methode zum BPA-Nachweis;
3. Entwicklung gewässeranalytischer Trennungs- und Nachweismethoden für Umweltproben;
4. Untersuchung der Bindung von Gewässerproben an den ER bzw. AR;
5. Untersuchung der östrogenen Wirkung von Gewässerproben in Zellkulturen durch Verwendung des ER als östrogenen Biomarker;
6. Einführung des RBP als Biomarker und Summenparameter für (anti)östrogene und (anti)androgene Wirkungen;
7. Untersuchungen zu möglichen Belastungen eines Gewässers mit (anti)östrogenen und / oder (anti)androgenen Substanzen;
8. Beispielhafte Analyse von verschiedenen ED in einem Oberflächengewässer.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 VERSUCHSTIERE

2.1.1 Herkunft und Haltung der Versuchstiere

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Krallenfrösche bzw. Kaulquappen entstammten der Amphibienhaltung der Abteilung Binnenfischerei des Instituts für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin. Sie wurden ursprünglich von der African Xenopus Facility (Knysna, Republic of South Africa) geliefert. Die adulten Krallenfrösche wurden in Kunststoffbehältern (Fassungsvermögen 50 L) gehalten, in die 30 L Leitungswasser gegeben wurden. Der Raum für die Froschhaltung hatte ausschließlich künstliche Lichtquellen, die eine regelmäßige Hell- und Dunkelphase von jeweils 12 Stunden Dauer gewährleisteten. Die Fütterung erfolgte zweimal wöchentlich, zum einen mit Fischfutter (fisch-fit, Alleinfutter für Forellen, Interquell, Wehringen) und zum anderen mit Chironomiden-Larven (G. Scheudienst Zierfischfutter, Berlin). Ebenfalls zweimal wöchentlich erfolgte ein Wasserwechsel und die Reinigung der Behälter.

Die Versuche mit *X. laevis* wurden vom Berliner Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) gemäß § 4,3 und § 6,1 Tierschutzgesetz Berlin unter der Antragsnummer G0141/00 genehmigt. Nicht genehmigungspflichtige Arbeiten mit den Tieren wurden bei der Behörde angezeigt.

2.1.2 Zucht der Versuchstiere

Chemikalien und Lösungen

HCG (Human Chorionic Gonadotropin)

Meersalz Tropic Marin®

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Dr. Biener GmbH,

Aquarientechnik, Wartenberg

H₂O entionisiert:

Leitfähigkeit < 18 µS / cm

RiOs 16, Millipore, Eschborn

Injektionslösung:

200 Units HCG / 100 µL H₂O entionisiert

Standardmedium:

2,5 g Meersalz / L H₂O entionisiert

Durchführung der Nachzucht

Geschlechtsreifen männlichen Fröschen wurden morgens 150 µL HCG-Lösung in den Rückenlymphsack gespritzt. Am Abend des gleichen Tages bekamen die Männchen erneut 150 µL Injektionslösung verabreicht und den Weibchen wurden 500 µL HCG-Lösung injiziert. Über Nacht wurden je ein Weibchen und ein Männchen in ein abgedunkeltes Plastikbecken gesetzt, in das 40 L Standardmedium gefüllt wurden. Dieses hatte eine dem Trinkwasser entsprechende Osmolarität. Mit einem Heizstab wurde das Wasser auf 21 °C erwärmt und über Sprudelsteine mit Sauerstoff belüftet. Am darauf folgenden Morgen wurden die erwachsenen Tiere aus den Becken entfernt. Bei erfolgreichem Laichvorgang befanden sich 1 000 bis 2 000 Eier in den Behältern. Aus durchschnittlich 75 % der Eier entwickelten sich Kaulquappen, denen sofort nach dem Schlüpfen das Futter verabreicht wurde. Als Futter wurde kommerziell erhältliches Jungfischaufzuchtfutter verwendet (Sera micron, Sera, Heinsberg).

2.2 CHARAKTERISIERUNG DER ÖSTROGENEN WIRKUNG VON BISPHENOL A *IN VIVO*

2.2.1 Exposition von Kaulquappen während der Larvalentwicklung

Mit Expositionsversuchen kann bei *X. laevis* getestet werden, ob bestimmte Substanzen einen Einfluss auf die Sexualdifferenzierung bei den Tieren haben. Dazu wurden die Substanzen, in der vorliegenden Arbeit BPA und als Positivkontrolle E2 (**Abb. 2-1**), in gelöster Form dem Standardmedium zugegeben. Die Methode wurde angewandt, um einen bestimmten Endpunkt, nämlich die Ausdifferenzierung der Gonaden zu Hoden oder Ovarien unter dem Einfluss von BPA, zu bestimmen und damit Aussagen über den Einfluss der getesteten Substanz zu treffen. Die zu Grunde liegenden Wirkmechanismen blieben bei diesem Versuchsansatz unberücksichtigt.

Es wurden zwei Expositionsversuche durchgeführt. Der erste Expositionsansatz diente dazu, die Auswirkungen der Behandlung auf die Sexualentwicklung der Tiere zu untersuchen. Der zweite Ansatz verfolgte das Ziel,

zusätzliche Daten über die wirksamen Konzentrationen, die Wirkungen auf die Gonadenentwicklung und das Abbauverhalten von BPA zu gewinnen.

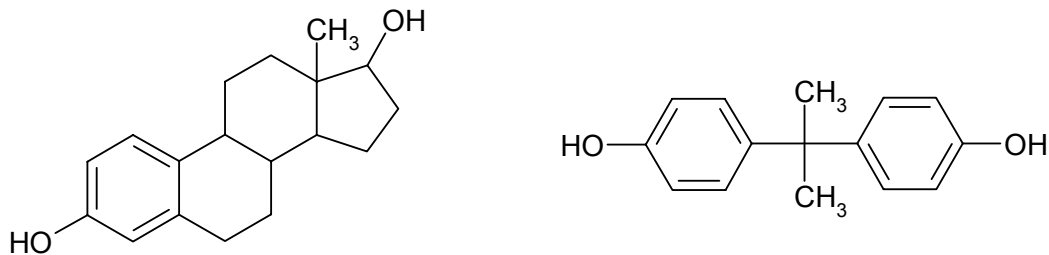


Abb. 2-1: Strukturformeln der in den Expositionsversuchen eingesetzten Substanzen E2 (links) und BPA (rechts).

Chemikalien und Lösungen

17β-Östradiol (E2)

Bisphenol A (BPA)

Ethanol 99 % p.a.

Standardmedium:

2,5 g Meersalz / L H₂O entionisiert

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Roth, Karlsruhe

Durchführung des ersten Expositionsansatzes

5 – 7 Tage nach der induzierten Laichabgabe und -befruchtung hatten die geschlüpften Kaulquappen das Entwicklungsstadium 42 – 43 erreicht und wurden in die Versuchsbecken eingesetzt. Dazu wurden 12,5 L fassende Glasbecken mit 10 L Standardmedium befüllt und in eine Brutrinne gestellt. Diese wurde mit destilliertem Wasser (23 °C) gefüllt, das um die Glasbecken zirkulierte, um eine konstante Temperatur in allen Becken zu gewährleisten. Das Standardmedium in den Glasbecken wurde durch Sprudelsteine mit Sauerstoff belüftet und in jedes Becken wurden 40 Kaulquappen des Stadiums 42 gegeben. Am Abend erfolgte eine erste Futterzugabe. Am nächsten Morgen wurde überprüft, ob die Kaulquappen ohne Schädigung das Umsetzen in die Versuchsbecken überstanden hatten, um eventuell geschädigte Tiere austauschen zu können. Danach erfolgte die erste Zugabe der Testsubstanzen. Der erste Versuchsansatz umfasste 10 Becken, davon 2 Lösungsmittelkontrollbecken (Ethanol 99 % p.a.). Kaulquappen in 4 Becken wurden als Positivkontrollen verwendet (E2 10⁻⁷ M und E2 10⁻⁸ M, je zwei Mal) und 4 Becken waren BPA-Testbecken (je zwei Mal BPA 10⁻⁷ M und BPA 10⁻⁸ M). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der Testsubstanzen wurden diese in Ethanol 99 % p.a. gelöst. Die Chemikalien bzw. das Lösungsmittel wurden jeweils in einem Volumen von 100 µL zugegeben. Che-

mikalienlösungen wurden ein Mal wöchentlich neu angesetzt und drei Mal in der Woche wurde das Wasser komplett gewechselt (montags, mittwochs, freitags). An diesen Tagen erfolgte jeweils eine erneute Testsubstanzen- und Futterzugabe, so dass sich ein semistatisches Expositionsregime ergab. Das Futter bestand im ersten Expositionsversuch aus einem Gemisch von 60 % Trockeneipulver, 30 % Brennesselpulver und 10 % Bierhefe, wovon anfangs 200 mg und ab Stadium 54 300 mg zugeben wurden. Dieses Futtergemisch wurde verwendet, um den ersten Expositionsansatz entsprechend den Bedingungen bei KLOAS ET AL. (1999) durchzuführen. Veränderungen im Tierbestand und die Wassertemperatur im Umgebungsbecken wurden notiert.

Durchführung des zweiten Expositionsansatzes

Dieser Ansatz unterschied sich im Vergleich zum ersten in der Art des Futters. Hierbei wurde kommerziell erhältliches Jungfischaufzuchtfutter verwendet (Sera micron, Sera, Heinsberg). Für die Behandlung der Tiere im Positivkontrollbecken wurde im zweiten Ansatz nur 10^{-7} M E2 eingesetzt, dafür wurde BPA in drei Konzentrationen zugegeben (10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M). Wiederum wurden für alle Behandlungsbecken und das Becken der Lösungsmittelkontrolle Vergleichsbecken mitgeführt.

2.2.2 Geschlechtsbestimmung der juvenilen Frösche

Chemikalien und Lösungen

Aminobenzoesäureethylmethansulfonat (MS-222)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
---	----------------------------

Betäubungslösung:

3 g MS-222 / L Leitungswasser

Fixiermedium:

Bouin-Fertiglösung

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Durchführung der Geschlechtsbestimmung

6 Wochen nach dem Schlüpfen hatten die ersten Kaulquappen die Metamorphose vollendet. Eine sofortige Entnahme der kleinen Frösche war erforderlich, weil diese zu Kannibalismus neigen und eine Gefahr für weniger weit entwickelte Kaulquappen in ihrem Becken sein können. Dann wurde das jeweilige Geschlecht identifiziert. Dazu wurden die Tiere in Betäubungslösung gelegt und durch einen Genickschnitt sowie durch Zerstörung des Rückenmarks mit einer Präpariernadel getötet. Daraufhin wurde die Bauchdecke

aufgeschnitten und die Gonaden freigelegt. Das Geschlecht der Tiere wurde mit Hilfe eines Binokulars (Zoom 2000, Leica Microsystems, Heidelberg) bestimmt, notiert und später der Gesamtauswertung zugeführt.

Nach 120 Behandlungstagen wurden die Versuche aufgelöst, die noch in der Metamorphose befindlichen Tiere wurden abgetötet und ihr Geschlecht bestimmt. Eine Geschlechtsbestimmung lässt sich ab Stadium 56 problemlos durchführen, da zu diesem Zeitpunkt eine morphologische Unterscheidung der Gonaden in Hoden und Ovarien möglich ist. Die Gonaden wurden direkt nach der Freilegung mit Bouin-Lösung fixiert, um die Gonadenstrukturen besser sichtbar zu machen. Die Geschlechtsbestimmungen wurden immer von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt.

Alle aufgeführten Vorgehensweisen wurden bei beiden Expositionsversuchen angewandt. Es gab jedoch zwei Änderungen des Ablaufs der Geschlechtsbestimmung während des zweiten Expositionsansatzes. Zum einen wurden die juvenilen Frösche vor der Geschlechtsuntersuchung gewogen und damit ihr Körpergewicht bestimmt. Zum anderen wurden nach der Geschlechtsbestimmung die fixierten Nieren-Gonaden-Komplexe herauspräpariert und in 70 % Ethanol für weitere histologische Untersuchungen aufbewahrt.

2.2.3 Histologische Untersuchung der Gonaden

Alle Hoden aus dem zweiten Versuchsansatz wurden histologisch untersucht, um mögliche zelluläre Veränderungen in den Geweben durch die BPA-Behandlung zu entdecken. Schnitte von Ovarien wurden nur stichprobenartig ausgewertet, da eine Veränderung der weiblichen Gonaden als unwahrscheinlich angenommen wurde.

Chemikalien und Lösungen

Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99 % p.a.	Roth, Karlsruhe
Einbettungsmedium:	
Rotiplast	Roth, Karlsruhe
Färbelösung:	
Eosin-Stammlösung	Merck, Darmstadt
Hämalaun-Stammlösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
Fixiermedium:	
Bouin-Fertiglösung	Sigma-Aldrich, Schnellendorf

Schnelleindeckmedium:

Entellan

Merck, Darmstadt

Durchführung der histologischen Untersuchungen

Die herauspräparierten Hoden-Nieren-Komplexe wurden in Bouin-Lösung drei Stunden fixiert und danach zwei Mal mit 70 % Ethanol gewaschen. Vor dem Anfertigen der mikroskopischen Schnitte erfolgte eine Überführung der Gewebe in Einbettkassetten und deren Entwässerung in einem Gewebereinbettautomaten (Barimed, Kuno Vieth Mikrotome GmbH, Wiesmoor). Die Entwässerung der fixierten Gonaden erfolgte mit Hilfe einer Ethanolkonzentrationsreihe (80 % – 2 h, 95 % – 2 h, 95 % – 2 h, 95 % – 2 h, 99 % – 1 h, 99 % – 2 h). Danach wurden die Gewebe mit Chloroform behandelt (insgesamt 3 Stunden) und schließlich in einer automatischen Gewebe-Ausblock-Station (DDM-P066/II, Roth, Karlsruhe) in Paraffin eingebettet (insgesamt 8 Stunden). Die Gewebeschnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (2065 Supercut, Leica Microsystems, Heidelberg) in einer Schnittdicke von 8 µm angefertigt. Nach dem Herstellen der Schnitte wurden diese auf Objektträger aufgezogen und durch leichte Erwärmung geglättet. Die Anfärbung der Präparate erfolgte in einem Färbeautomaten (HMS, Carl-Zeiss Inc., Jena) mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung. Dazu wurde 1 %ige wässrige Eosinlösung mit Hämalaun-Fertiglösung nach Mayer im Verhältnis 8 : 1 gemischt und in den Färbeautomaten gefüllt. Nach der Färbung zeigten sich die Zellkerne blau und das Cytoplasma rot gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mit Schnelleindeckmedium eingedeckelt.

Die Analyse der histologischen Präparate wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Olympus BX50, Olympus Optical Europe, Hamburg) durchgeführt. Schließlich wurden die Objekte mit einer Digitalkamera fotografiert und die Bilder mit einer Bildbearbeitungssoftware gespeichert (ColorView 12 und analySIS 3.1, Soft Imaging System, Münster).

2.2.4 Kurzzeitige Kaulquappenexposition mit BPA und Bestimmung der ER-mRNA-Expression

Dieser Versuch diente dazu, die östrogene Wirkungsweise von BPA in den Kaulquappen näher zu bestimmen. Dabei sollte gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Exposition der Tiere mit BPA die Expression eines typischen östrogenen Biomarkers induzieren konnte. Ein geeigneter östrogen Biomarker ist der ER (BÖGI ET AL. 2002), dessen mRNA-Expression in Kaulquappen

in diesem Versuchsansatz nachgewiesen wurde. Der Nachweis erfolgte durch die Reverse Transcriptase - Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR). Die RT-PCR ist eine Methode, welche die reverse Transkription (RT) der mRNA mit der Amplifizierung der daraus erhaltenen komplementären DNA (cDNA) durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) verbindet (BYRNE ET AL. 1988; WANG ET AL. 1989).

2.2.4.1 Kurzzeitige Exposition der Kaulquappen mit BPA

Die Kaulquappen wurden wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben gezüchtet und aufgezogen. Es wurden jeweils 10 Kaulquappen im Entwicklungsstadium 50 in Glasbecken gegeben und mit Ethanol 99 % p.a., 10^{-7} M E2 and 10^{-7} M BPA zwei Wochen lang behandelt. Die Versuchsdurchführung glich derjenigen in Kapitel 2.2.1.

2.2.4.2 RNA-Isolierung

Chemikalien und Lösungen

Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70 %	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

Durchführung der RNA-Isolierung

Nach zwei Wochen wurden die Kaulquappen aus den Glasbecken genommen und mit 500 µL Trizol bei -70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren. Die Gesamt-RNA wurde aus Ganzkörperhomogenaten der einzelnen Tiere gewonnen. Die RNA-Isolierung fand in verschiedenen RNase-freien Eppendorfgefäßen statt, um einen schnellen Abbau der RNA zu verhindern. Die aufgetauten Kaulquappen wurden mit einem Ultra Turrax Homogenisator (T8, IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Danach wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch Zugabe von 150 µL Chloroform wurde die lipophile von der hydrophilen Phase getrennt. Die Proben wurden geschüttelt, bei Raumtemperatur 3 min inkubiert und bei 12 000 g und 4 °C 15 min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH,

Hanau). 300 µL des RNA-haltigen Überstandes wurden abgenommen und die RNA wurde durch Zugabe von 375 µL Isopropanol ausgefällt. In einem weiteren Schritt wurden die Proben gründlich geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol 70 % gewaschen und anschließend 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA wurde in 100 µL sterilisiertem, bidestilliertem Wasser resuspendiert, das 0,01 % DEPC enthielt. Der RNA-Gehalt wurde bei einer Absorptionswellenlänge von 260 nm in einem Mikroplattenreader (Spectraflour Plus, Tecan, Crailsheim) gemessen. Zusätzlich wurden Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Der Quotient aus den Extinktionswerten (260 nm / 280 nm) einer Probe stellt ein Maß für die Reinheit der RNA-Extraktion dar. Diese Extraktionsmethode ergab eine durchschnittliche RNA-Ausbeute zwischen 100 und 250 µg RNA pro Kaulquappe und die Reinheit der Extraktionen lag zwischen 1,8 und 2.

2.2.4.3 Reverse Transkription (RT)

Chemikalien und Lösungen

AMV-Reverse Transcriptase (RT, 20 Units / µL)	Biometra, Göttingen
AMV-RT-Puffer	Biometra, Göttingen
Zusammensetzung:	
Tris-HCl (pH 8,3)	500 mM
MgCl ₂	60 mM
KCl	400 mM
Dithiothreitol (DTT)	40 mM
dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP jeweils 10 mM)	Finnzymes, Espoo, Finnland
PolydT-Primer	Biometra, Göttingen
Sequenz: 5'-CCT GAA TTC TAG AGC TCA TTT TTT TTT TTT TT-3'	
PCR-Wasser:	
H ₂ O bidestilliert, autoklaviert	
RNA-Lösung:	
0,125 µg RNA / µL	

Durchführung der RT

Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) vorgenommen. Jede Probe wurde in zwei separaten An-

sätzen umgeschrieben. 8 µL RNA-Lösung wurden zusammen mit 12 µL eines 4 µM PolydT-Primers 3 min in einem Thermocycler (T1, Biometra, Göttingen) auf 70 °C erhitzt und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurde ein Gemisch aus 4,5 µL PCR-Wasser, 3 µL RT-Puffer, 2 µL dNTP Mix und 0,5 µL RT zu jeder Probe gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C im Thermocycler, die mit einer zweiminütigen Erhitzung auf 90 °C beendet wurde. Wenn die cDNA nicht unmittelbar für die PCR benutzt wurde, konnten die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert werden.

2.2.4.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Eine Quantifizierung von mRNA ist unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion möglich, da über eine bestimmte Anzahl von Zyklen ein konstanter exponentieller Zusammenhang zwischen PCR-Produkt und Zyklenzahl besteht. Daher kann anhand der Menge des PCR-Produktes auf die Menge an eingesetzter Matrizen-cDNA geschlossen werden.

Chemikalien und Lösungen

dNTP Mix	Finnzymes, Espoo, Finnland
(dATP, dGTP, dCTP, dTTP jeweils 10 mM)	
EF-Primer forward	Biometra, Göttingen
Sequenz: 5'-TGC CAA TTG TTG ACA TGA TCC C-3'	
EF-Primer reverse	Biometra, Göttingen
Sequenz: 5'-TAC TAT TAA ACT CTG ATG GCC-3'	
ER-Primer forward	TipMOL, Berlin
Sequenz: 5'-ATT TCG CAT GAT GAG GTT ACG-3'	
ER-Primer reverse	TipMOL, Berlin
Sequenz: 5'-TAG TGG TAG GTG GAC TCC GG-3'	
PCR-Puffer	Hybaid, Heidelberg
Zusammensetzung:	
Tris-HCl (pH 8,55)	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Taq-Polymerase (4 Units / µL)	Hybaid, Heidelberg
cDNA-Lösung	

Durchführung der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation bestimmter cDNA-Abschnitte. In diesem Ver-

suchsansatz wurde sie zur Bestimmung der ER-cDNA-Sequenz von *Xenopus laevis* benutzt (WEILER ET AL. 1987). Dazu wurden spezifische ER-Primer hergestellt. 5 µL cDNA-Lösung wurden mit 16,7 µL PCR-Wasser, 2,5 µL PCR-Puffer, 0,2 µL dNTP Mix, 0,2 µL ER-Primer forward, 0,2 µL ER-Primer reverse und 0,2 µL *Taq*-Polymerase gemischt. Die Amplifikation wurde im Thermocycler durchgeführt und mit einer einminütigen Erhitzung auf 94 °C gestartet. Dadurch wurde die cDNA denaturiert. Danach folgten 37 Zyklen dreier Temperaturschritte (94 °C – 1 min, 60 °C – 1 min, 72 °C – 1 min) und die Reaktion wurde nach dem letzten Schritt des letzten Zyklus gestoppt, indem die Temperatur 2 min auf 72 °C gehalten und danach auf 10 °C abgekühlt wurde. Das amplifizierte ER-Produkt umfasste 407 Basenpaare (bp). Alle PCR-Durchgänge wurden doppelt ausgeführt.

Als interner Standard wurde der Elongationsfaktor 1α (EF) von *X. laevis* verwendet (DOSTAL ET AL. 1994; DOSCH ET AL. 1997). Die PCR für den EF wurde entsprechend der Methode von KLOAS ET AL. (1999) durchgeführt. Die PCR-Produkte hatten eine Länge von 285 bp und die Amplifikation wurde nach 23 Zyklen gestoppt.

2.2.4.5 Darstellung der PCR-Produkte

Lösungen und Chemikalien

Agarose	Roth, Karlsruhe
BioLadder 100	Hybaid, Heidelberg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
TAE-Puffer (pH 8,5):	
Tris-HCl 20 mM	Serva, Heidelberg
NaEDTA 1 mM	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Probenpuffer (Anteile: 1 : 5 : 4):	
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DEPC-Wasser	
Glycerin	Merck, Darmstadt
PCR-Produkte	

Durchführung

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. 5 µl der entsprechenden PCR-Produkte wurden mit einem Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Eine horizontale Gelelektrophorese wurde in einer Gelkammer (Agagel, Biometra, Göttingen) mit einem 1,5 %igem Agarosegel

in einem TAE-Puffer für 45 min bei einer Spannung von 60 mV angelegt. 10 mL flüssigem Gel wurden 3 µL Ethidiumbromid (0,1 µg / µL) zugegeben. Dadurch konnten die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht werden, denn die entsprechenden cDNA-Amplifikate fluoreszierten durch eingelagertes Ethidiumbromid. Die Menge an amplifizierter cDNA konnte mit der gemessenen Fluoreszenz korreliert werden. Die Fluoreszenzintensität wurde durch densitometrische Messungen mit einem Image Analyzer (Gel Doc 2000, Bio-Rad, München) bestimmt. Die Fluoreszenzwerte des EF wurden genutzt, um die ER-Werte zu normalisieren. Die normalisierten Werte der BPA- und E2-behandelten Kaulquappen wurden mit den Werten der Kontrolltiere verglichen. Zur Überprüfung der Produktspezifität wurde die amplifizierte cDNA mit dem QIAquick Gelextraktions-Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert, gereinigt und von Sequence Laboratories (Göttingen) durch *Taq*-Cycle-Sequenzierung analog zur Didesoxymethode von SANGER ET AL. (1977) sequenziert.

2.2.5 Chemische Analyse von BPA in den Expositionsversuchen

Zum Nachweis, in welcher Konzentration die zu testende Substanz BPA tatsächlich im Standardmedium vorhanden war, war es erforderlich, chemische Analysen des Expositionswassers vorzunehmen. Zusätzlich konnte überprüft werden, dass sich BPA tatsächlich nur in den Testbecken befand und nicht in den Kontroll- oder Positivkontrollbecken. Durch eine Probenentnahme in einem bestimmten Zeitintervall ließ sich die Änderung der BPA-Konzentration im Zeitverlauf bestimmen.

Chemikalien und Lösungen

Aceton (HPLC grade)	Roth, Karlsruhe
Acetonitril (HPLC grade)	Roth, Karlsruhe
Methanol (HPLC grade)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Octadecyl (C18, Bakerbond)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Quecksilberchlorid (HgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Phosphatpuffer (0,01 M, pH 6):	
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt

Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) Merck, Darmstadt

Durchführung der BPA-Analyse

Der BPA-Gehalt im Wasser aller Glasbecken des zweiten Expositionsansatzes wurde chemisch analysiert. Dazu wurden Wasserproben unmittelbar nach der Chemikalienzugabe entnommen. Weiterhin wurde die BPA-Konzentration in den Becken in Zeitintervallen von 6 Stunden über einen Gesamtzeitraum von 48 Stunden gemessen, also zwischen zwei aufeinander folgenden Wasserwechseln. Die Wasserproben der Zeitverläufe stammten aus drei verschiedenen Behandlungsbecken: Erstens aus Becken des Expositionsansatzes, in denen sich folglich BPA, Standardmedium, Futter und Kaulquappen befanden. Zweitens aus Becken, die BPA, Standardmedium und Futter enthielten sowie drittens aus Becken, die nur BPA und Standardmedium beinhalteten. Probenentnahme und Analyse wurden dreifach ausgeführt, in einigen wenigen Fällen zweifach.

Es wurden jeweils 0,5 – 2 L Wasser entnommen, abhängig von der zugesetzten BPA-Konzentration. Zu jeder Wasserprobe wurde 1 mL $HgCl_2$ / L Wasser gegeben, um Mikroorganismen abzutöten, die durch Stoffwechselprozesse die Inhaltsstoffe der Wasserproben verändern können. Die Proben wurden in Glasflaschen (Schott Duran, Merck, Darmstadt) bei -20 °C aufbewahrt. Für die Extraktion von BPA aus den Wasserproben wurde eine Festphasenextraktionsmethode verwendet. Glasfritten wurden mit 500 mg Octadecyl gefüllt und mit Aceton, Methanol und 0,01 M Salzsäure (pH 2) konditioniert. Die Wasserproben wurden aufgetaut und in 500 mL von diesen wurden jeweils 2,5 g NaCl gegeben. Mit Salzsäure wurden die Proben auf pH 2 eingestellt. Die konditionierte Extraktionssäule wurde mit den Wasserproben beschickt. Der Durchlauf des Wassers durch die Säule erfolgte zuerst durch die Schwerkraft. Schließlich wurde mit einer Vakuumpumpe der in der Säule verbliebene Flüssigkeitsrest ausgetrieben, wobei eine Fließrate von ungefähr 15 mL / min entstand. BPA wurde mit 2 x 2,5 mL Aceton aus den Säulen eluiert. Das Eluat wurde unter Stickstoffatmosphäre in einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Büchi, Konstanz) zur Trockene eingengt und in Acetonitril wieder aufgenommen.

Die Bestimmung der BPA-Konzentration erfolgte durch Trennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) und anschließender Fluoreszenzmessung (Gynkotek HPLC, Idstein). Zur Auftrennung wurde eine 250 mm x 3 mm Ultrasep ES Säule (Sepserv, Berlin) verwendet, die isokratisch mit einem Laufmittelgemisch aus 65 % Acetonitril und 35 % eines 0,01 M Phosphatpuffers (pH 6) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 mL / min betrieben wurde. Die BPA-Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlicht mit einer Anregungswellenlänge

von 229 nm und einer Emissionswellenlänge von 360 nm. Die BPA-Konzentrationen wurden quantifiziert, indem die Werte der Integrale der BPA-Peaks mit den Werten aus einer BPA-Standardkurve verglichen wurden. Um Aussagen über die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit der Methode zu erhalten, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Wiederfindungsrate für BPA ermittelt (s. Kapitel 3.1.4).

2.3 GEWÄSSERUNTERSUCHUNGEN

2.3.1 Charakterisierung des Untersuchungsflusses

Die Alb ist ein kleiner Nebenfluss des Rheins. Sie hat eine Länge von ca. 50 km und ein Einzugsgebiet von ungefähr 460 km², wovon ein Drittel im Buntsandsteingebiet des Schwarzwaldes liegt. Ihre Quelle befindet sich in der Nähe von Bad Herrenalb (Baden-Württemberg). Die Fließgeschwindigkeiten im Oberlauf liegen bei durchschnittlich 0,5 m / s und verlangsamen sich im Unterlauf auf ca. 0,3 m / s (LFU 1982). Der mittlere Abfluss liegt bei 2,34 m³ / s (1964-1996). Bevor die Alb in den Rhein mündet, durchquert sie die Stadt Karlsruhe und ein Raffineriegelände (weitere Angaben: HUBER ET AL. 1994; LFU 1997; SCHÄFER 1999).

Abbildung 2-2 zeigt die geographische Lage der gewählten Probenahmestellen und ein Schema ihrer Anordnung im Flussverlauf. Es wurde eine unbelastete Referenzstelle im Quellgebiet gewählt (Alb 0). Die anderen Stellen gruppierten sich um zwei Kläranlagenausläufe (Alb 2, Alb 5) herum, jeweils eine Stelle flussaufwärts (Alb 1, Alb 4) und eine Stelle flussabwärts (Alb 3, Alb 6) des Einleiters.

In **Tabelle 2-1** wurden die wichtigsten Lagemerkmale der einzelnen Probennahmestellen vermerkt. Diese wurden durch Begehung der unmittelbaren Umgebung der jeweiligen Stellen erfasst. Die Begehung fand kreisförmig um den Ort der Probennahme statt und der Radius des Begehungskreises betrug – wenn keine Hindernisse den Weg versperrten – ungefähr 300 m.

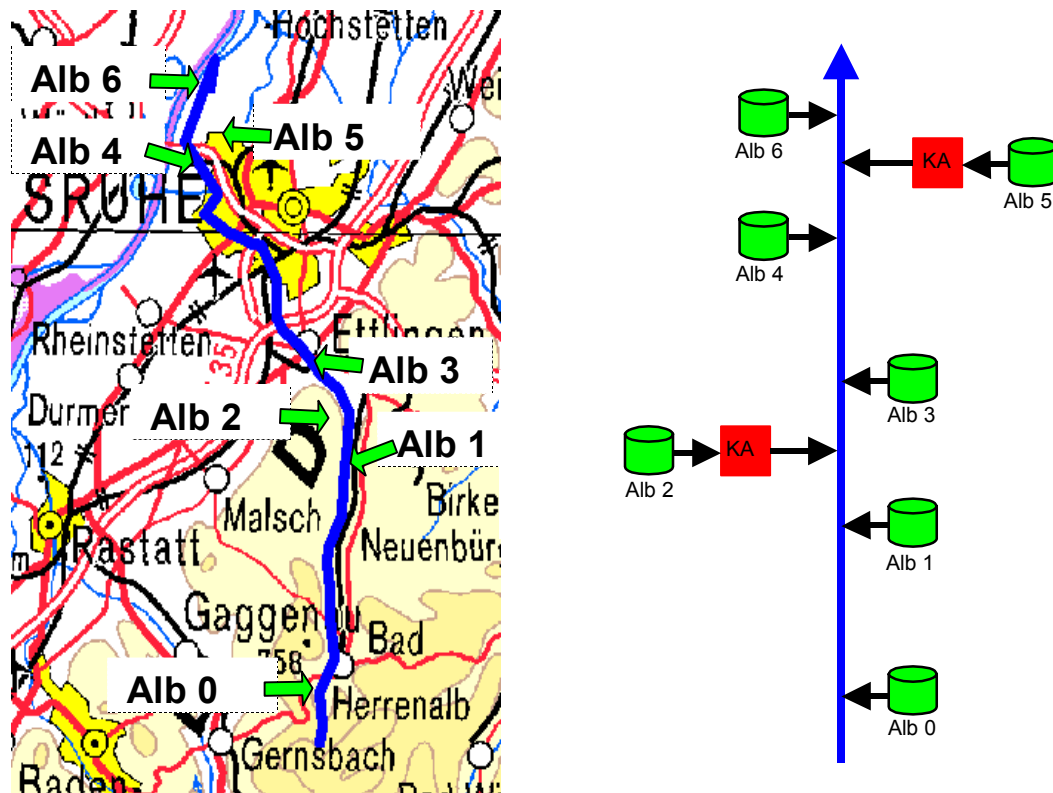


Abb. 2-2: Geographische Lage des Modellgewässers (links) und schematische Darstellung der Probennahmestellen im Flussverlauf (rechts). KA: Kläranlagenauslauf.

Tab. 2-1: Lagemerkmale der einzelnen Probennahmestellen entlang des Flussverlaufs der Alb.

Bezeichnung	Beschreibung der Probennahmestelle
Alb 0	Liegt ca. 2 km unterhalb der Quelle bei Bad Herrenalb, keine Einleiter bekannt, möglicherweise Eintrag durch Vieh- und Forstwirtschaft. Am Ort ist die Alb ca. 2 – 3 m breit, 10 – 50 cm tief, linkes Ufer bewaldet, rechtes Ufer offengelassene Weide.
Alb 1	Probennahme in Fischweier, ca. 3 km oberhalb der Kläranlage Neurod, mögliche Einleitung durch Landwirtschaft, Bahn- und PKW-Verkehrseinflüsse möglich; Linkes Ufer Weide, rechtes Ufer Bäume und Bahndamm; Alb ca. 3 – 4 m breit und 20 – 60 cm tief.
Alb 2	Auslaufwasser der Kläranlage Neurod, die Abwasser von 40 000 Einwohneräquivalenten und ausschließlich kommunales Abwasser der Albtalgemeinden bearbeitet.

Alb 3	Probennahme ca. 2 km unterhalb der Kläranlage Neurod und etwa 500 m vom Einleitungskanal der Kläranlage entfernt am Ortseingang von Ettlingen. Die Alb hat hier das Industriegebiet „Ettlinger Spinnerei“ durchflossen, der Fluss ist 4 – 5 m breit und 50 – 70 cm tief, linkes Ufer Firmengelände, rechtes Ufer Bäume und Parkplatz.
Alb 4	Probennahme am Ortsausgang Karlsruhe-Knielingen, ca. 1 km vor Eintritt in Raffineriegelände und 2,5 km vor Einleitungskanal der Kläranlage Neureut, Alb verlässt hier Karlsruher Stadtgebiet; der Fluss ist 8 – 10 m breit, 80 – 100 cm tief; linkes und rechtes Ufer als Damm mit Spazierwegen angelegt.
Alb 5	Auslaufwasser der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, die im Gewerbegebiet Neureut-Süd liegt und Abwasser von 740 000 Einwohneräquivalenten bearbeitet, wobei es sich um Industrie- und kommunales Mischabwasser handelt.
Alb 6	Probennahme in der Nähe des Baggersees Eggenstein, max. 1 km vor der Mündung; Entfernung zum Einleitungskanal der Kläranlage Neureut ca. 2,5 km; der Fluss ist ca. 10 m breit und 100 – 250 cm tief und beiderseits von einem Damm eingefasst, wobei sich hinter dem linken Uferdamm die Rheinaue befindet.

2.3.2 Entnahme der Gewässerproben

An den jeweiligen Probennahmestellen des Flusses (Alb 0, 1, 3, 4, 6) wurden 40 – 50 L Wasser entnommen. Die Entnahme erfolgte jeweils in der Flussmitte, ungefähr 10 cm unter der Wasseroberfläche. Die Temperatur des Wassers wurde vor Ort gemessen und die Proben wurden in Glasbehältern zur Aufarbeitung in die Kläranlagen gefahren. Die Proben unterschiedlicher Flussabschnitte wurden zu ähnlichen Zeitpunkten an aufeinanderfolgenden Tagen genommen. Das Kläranlagenauslaufwasser wurde auf dem Gelände der beiden Kläranlagen direkt aus dem Auslaufkanal entnommen, wobei aufgrund des hohen Schwebstoffgehaltes nur 10 – 15 L des Kläranlagenauslaufs Alb 5 extrahiert wurden.

Es fanden drei Probennahmen zu unterschiedlichen Jahreszeiten statt, und zwar im Juli 2001, im Oktober 2001 und im Februar 2002.

2.3.3 Extraktion der Gewässerproben

Chemikalien und Lösungen

Aceton	Roth, Karlsruhe
Dichlormethan	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
n-Hexan	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat (NaSO ₄)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 3,7 % (HCl)	Merck, Darmstadt

Durchführung der Extraktion

Die Extraktion der Gewässerproben erfolgte jeweils auf dem Gelände der Kläranlagen, so dass eine unmittelbare Aufarbeitung durch kurze Transportwege gewährleistet war. Dies war erforderlich, um mögliche mikrobielle Prozesse, die zur Veränderung der Zusammensetzung der Wasserinhaltsstoffe führen könnten, so gering wie möglich zu halten. Die Extraktionsmethode war eine Festphasenextraktion über C18-Extraktionsdisks (3M Empore High Performance Extraction Disks, 3M Center, St. Paul, USA). Zuvor wurde das Wasser mit 3,7 %iger Salzsäure angesäuert (pH 2) und mit NaCl (2,5 g / L Wasser) versetzt. Dann wurde es durch Glasfaserfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) mit 50 µm Porendurchmesser filtriert und anschließend mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch die Extraktionsdisks gesaugt, die vorher mit jeweils 20 mL Aceton, Methanol und 0,01 M Salzsäure (pH 2) konditioniert wurden. Je nach Probennahmestelle konnten 1 – 4 L Wasser pro Disk extrahiert werden. Die Extraktionsdisks wurden in Alufolie verpackt, kühl gelagert und im Labor weiter bearbeitet.

Die Disks wurden im Labor unter Stickstoffatmosphäre getrocknet und daraufhin wurden die zurückgehaltenen Substanzen aus den Disks eluiert. Um ein möglichst großes Spektrum an Substanzen herauszulösen, wurden drei unterschiedlich polare Lösungsmittel (Aceton, Dichlormethan und Hexan) im Überschuss zugegeben. Die so erhaltenen Gesamtextrakte wurden mit einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Büchi, Konstanz) unter Stickstoffatmosphäre bis zur Trockene eingengt und in einem Dichlormethan / Hexan-Gemisch (30 % zu 70 %) aufgenommen. Anschließend erfolgte noch eine Filtration über eine NaSO₄-Säule, um bestimmte Makromoleküle (z.B. Chlorophylle) zu entfernen. Die Gesamtextrakte wurden daraufhin der Fraktionierung zugeführt. Die Extrakte waren gegenüber den Originalproben 1 000-fach konzentriert.

2.3.4 Fraktionierung der Gewässerextrakte

Chemikalien und Lösungen

Dichlormethan	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
n-Hexan	Roth, Karlsruhe

Durchführung der Fraktionierung

Die Fraktionierung der Wasserextrakte aus der Alb wurde entsprechend der Methode von SNYDER ET AL. (1999) durchgeführt und unseren Laborbedingungen angepasst. Es handelte sich um eine Normalphasenchromatographie mit einer Trennsäule (Phenomenex, Aschaffenburg, Luna 5 µm Silica Säule (250 mm x 4,6 mm)). Zur Auftrennung wurde eine präparative HPLC (System Gold, Beckman, Fullerton, USA) verwendet und die Fraktionen wurden von einem automatischen Probensammler (ISCO Fraktionensammler, Foxy 200, Colora Messtechnik, Lorch) aufgenommen. Zur Herstellung der ersten drei Fraktionen diente eine dreistufige, isokratische Arbeitsweise, wobei die einzelnen Stufen in der Abfolge 15 min 30 % Dichlormethan in Hexan, 20 min Dichlormethan, 20 min Methanol bei einer jeweiligen Fließgeschwindigkeit von 1 mL / min und einer Beladung der Säule mit jeweils 2,5 mL Extrakt durchgeführt wurden.

2.3.5 Analyse der Gewässerproben

Die Analyse der Gewässerproben erfolgte mittels Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC / MS), da sich aufgrund der Vielzahl der Substanzen in Gewässerproben die HPLC-Methode als ungeeignet erwies. Das Grundprinzip der Massenspektrometrie ist es, aus anorganischen oder organischen Substanzen in geeigneter Weise Ionen zu erzeugen und diese Ionen nach ihrer Masse und Ladung zu trennen. Ein entsprechendes Registriersystem erlaubt danach die qualitative und quantitative Erfassung der Ionen nach Masse und Häufigkeit. Das Massenspektrum spiegelt also das Verhältnis von Ionenmasse zu Ionenladung wider. Anhand von Referenzspektren lassen sich gut substanzklassenspezifische Charakteristika erkennen. Mit Hilfe von Spektrenbibliotheken können dann unbekannte Verbindungen identifiziert werden.

Chemikalien und Lösungen

Hexan

Roth, Karlsruhe

Fraktionen der Gewässerextrakte

Durchführung

Zur Probenvorbereitung wurden die Eluate mit einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Büchi, Konstanz) bei 30 °C unter Stickstoffatmosphäre bis zur Trockene eingeeengt. Anschließend wurden sie in Hexan aufgenommen. Dabei wurde das Volumen des Lösungsmittels so gewählt, dass eine 1 000-fache Aufkonzentrierung der Proben vorlag.

Die Analyse der Proben erfolgte mit einem GC / MS-System (Agilent 6890 Network GC System, Agilent 5973 Network Mass Selective Detector, Agilent Technologies, PaloAlto, Ca., USA). Es wurden jeweils 2 µL der zu trennenden Proben injiziert. Zur Trennung wurden Helium als inertes Trägergas mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1,3 mL / min sowie eine Trennsäule (DB5ms, 0,25 mm x 60 m x 0,25 µm) verwendet. Bei 720 °C wurden die Proben im Injektor in die Gasphase überführt. Das Ofentemperaturprogramm startete bei 50 °C. Zuerst wurde auf 130 °C mit einer Aufheizrate von 20 °C / min erhitzt. Die weiteren Schritte waren: 10 min Erhitzung auf 145 °C (4,2 °C / min), 10 min Erhitzung auf 240 °C (4,1 °C / min) und 10 min Erhitzung auf 320 °C (3 °C / min). Das Interface hatte bei den Analysen in der vorliegenden Arbeit eine Temperatur von 280 °C. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in einem Scanbereich von 50 – 500 amu (atomic mass units) und zur Auswertung der erhaltenen Spektren wurde die Spektrenbibliothek NIST02 (SIS, Ringoes, NJ, USA) verwendet.

2.4 BIOASSAYS ZUR UNTERSUCHUNG DER GEWÄSSEREXTRAKTE

2.4.1 Rezeptorbindungsstudien

Mit dieser Methode sollten die Steroidrezeptoren ER und AR bezüglich ihres Bindungsverhaltens für bestimmte Liganden charakterisiert werden. Die Messung der Bindung erfolgte über mit Tritium radioaktiv markiertem E2 oder T. Nicht gebundenes [³H]-E2 oder [³H]-T wurde aus den Ansätzen entfernt. So ließ sich zuerst die Gesamtbindung (total binding, TB) ermitteln, bei der alle Rezeptoren besetzt sind. Die unspezifische Bindung (non-specific bin-

ding, NB) wurde festgestellt, indem die natürlichen Liganden (E2 oder T) im Überschuss zugegeben wurden, damit alle Rezeptoren von diesen besetzt werden konnten und die gemessene Strahlungsenergie von markierten Liganden stammen musste, die unspezifisch an im Cytosol vorhandene Proteine gebunden waren. Die Differenz aus Gesamt- und unspezifischer Bindung ergab folglich die spezifische Bindung (specific binding, SB) des markierten Liganden an den entsprechenden Rezeptor. Durch Zugabe von unmarkierten Hormonen oder Testsubstanzen konnten die markierten Liganden von den Rezeptoren verdrängt werden.

Mit dieser Methode lassen sich sowohl kinetische Experimente als auch Konkurrenzexperimente durchführen. Da im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob in den Gewässerextrakten Substanzen vorhanden waren, die an den AR oder ER binden, wurden ausschließlich Konkurrenzexperimente durchgeführt. Für die grundlegenden Aussagen zur Bindungsaffinität und zur Sättigungskonzentration wurde auf die Ergebnisse umfangreicher Untersuchungen von LUTZ (1999) zurückgegriffen.

Ein Maß für die Affinität, also für die Bindungsstärke zwischen Rezeptor und Ligand, ist die Dissoziationskonstante K_d . Diese stellt die Konzentration des markierten Liganden dar, wenn dieser 50 % der Rezeptoren besetzt hat. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Wettbewerbs- oder Verdrängungsexperimenten wurden die Radioliganden ($[^3\text{H}]\text{-E2}$ oder $[^3\text{H}]\text{-T}$) in der Konzentration der K_d -Werte eingesetzt. Die Verdrängungskapazität der zu untersuchenden Substanz oder Gewässerprobe wurde bestimmt, indem diese in steigender Konzentration zugegeben wurde. Dadurch wurde der markierte Ligand verdrängt und der Messwert sank proportional zur Verdrängung. Daraus ließen sich Verdrängungskurven ableiten, die durch eine logit-log Transformation linearisiert wurden. Weiterhin wurde der IC_{50} -Wert (inhibiting concentration 50 %) bestimmt, bei dem 50 % des gebundenen markierten Liganden verdrängt wurden.

Chemikalien und Lösungen

17 β -Östradiol (E2)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Testosteron (T)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-HCl-Puffer (direkt vor Gebrauch frisch anzusetzen):	
Tris-HCl (20 mM)	Roth, Karlsruhe
Saccharose (250 mM)	Merck, Darmstadt
Na ₂ -Molybdat (10 mM)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (5 mM)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Aktivkohlesuspension:	
Tris-HCl-Puffer	
Aktivkohle Norit A (4 – 7 μm ; 3,75 %)	Serva, Heidelberg

Dextran T 70 (0,375 %)	Roth, Karlsruhe
Hormonlösung (radioaktiv):	
[³ H]-17 β -Östradiol, 52,0 Ci / mmol	Amersham, Freiburg
Ethanol 5 %	Merck, Darmstadt
[³ H]-Testosteron, 96,0 Ci / mmol	Amersham, Freiburg
Szintillationscocktail Ultima Gold	Perkin Elmer, Köln

Durchführung der kompetitiven Rezeptorbindungsstudien

Um aus der Leber von *Xenopus laevis* das die Steroidrezeptoren enthaltende Cytosol zu gewinnen, wurde der Tris-HCl-Puffer für jeden Versuch neu angesetzt und sofort auf Eis gestellt. Ein männlicher *Xenopus laevis* wurde durch Eis immobilisiert, mit einer Schere wurde das Genick durchgeschnitten und anschließend das Rückenmark mit einer Präpariernadel zerstört. Die beiden Leberlappen wurden herauspräpariert, in eiskalten Tris-HCl-Puffer gelegt und gewogen. In einem Potter (B. Braun Biotech, Melsungen) wurde die Leber homogenisiert und dann gleichmäßig auf Zentrifugenröhrchen verteilt. In einer Ultrazentrifuge (CO-L60, Beckman, München) wurde mit 12 000 g 12 min bei 4 °C zentrifugiert. Der cytosolhaltige Überstand wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte der zweite einstündige Zentrifugationsschritt mit 35 000 g bei 4 °C. Der Überstand, der das rezeptorhaltige Cytosol enthielt, wurde abgenommen und mit Tris-HCl-Puffer verdünnt, so dass pro Gramm Leber 8 mL Cytosol vorlagen. Dieses wurde sofort auf Eis gekühlt.

Die natürlichen Liganden (E2 und T) wurden als 10⁻² M Stammlösungen angesetzt. Diese dienten der Herstellung einer Konzentrationsreihe (10⁻⁴ M – 10⁻⁹ M). Die 1 000-fach angereicherten Extrakte der Gewässerproben wurden ebenfalls in einer Konzentrationsreihe angesetzt, und zwar unverdünnt, 1 : 2, 1 : 10 und 1 : 50 verdünnt. Schließlich wurden die Lösungen der radioaktiv markierten Liganden hergestellt, so dass im Ansatz 15 nM [³H]-E2 bzw. 20 nM [³H]-T vorlagen.

Die Inkubationsansätze enthielten jeweils 25 μ L [³H]-E2 oder [³H]-T, 150 μ L Tris-HCl-Puffer, 100 μ L Lebercytosol und 10 μ L Wasserextrakt. Wasserextrakte wurden parallel zu einer Konzentrationsreihe von 10⁻⁹ M bis 10⁻⁴ M unmarkierten E2 oder T eingebracht. Somit konnte in der Auswertung ein Vergleich des kompetitiven Verdrängungspotentials der Extraktinhaltsstoffe mit dem des natürlichen Liganden durchgeführt werden.

Der Versuchsansatz wurde abgestoppt, indem 300 μ L Aktivkohlesuspension zu den Proben gegeben und 5 min inkubiert wurde. Als nächstes wurde 15 min mit 3 500 g zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die rezeptorgebundenen Steroide, wohingegen die freien Steroide an die Aktivkohle gebunden und sedimentiert waren. Vom Überstand wurden 400 μ L abge-

nommen und zu maximal 3 mL Szintillationsflüssigkeit in spezielle Plastikfläschchen (PonyVials (Polyethylen), Perkin Elmer, Köln) gegeben. Die Fläschchen wurden geschüttelt und in einen Flüssigkeitsszintillationszähler (LSC, TriCarb 1900TR, Packard, Frankfurt) zum Messen gestellt.

2.4.2 Induktion der Expression von Biomarkergenen durch Behandlung von primären Hepatocytenkulturen

Aus Lebern von adulten männlichen *X. laevis* wurden Zellkulturen hergestellt, die mit unterschiedlichen Substanzen und Gewässerextrakten in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden, um die Expression bestimmter Biomarkergene zu induzieren. Bei diesen Biomarkern handelte es sich zum einen um den östrogenen Biomarker ER, welcher der Regulation durch östrogene oder östrogenartige Substanzen unterliegt. Zum anderen wurde das RBP als Biomarker etabliert. RBP wird antagonistisch durch männliche und weibliche Sexualsteroiden reguliert und konnte erfolgreich eingesetzt werden, um Aussagen über verschiedene Wirkmechanismen der Testsubstanzen und der Gewässerextrakte zu erhalten.

2.4.2.1 Herstellung der Zellkulturen

Chemikalien und Lösungen

Aminobenzoessäureethylmethansulfonat (MS-222)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
---	----------------------------

Heparin	Serva, Heidelberg
---------	-------------------

Trypan-Blau	Merck, Darmstadt
-------------	------------------

Betäubungslösung:

4 g MS-222 / L Leitungswasser

Heparinlösung:

5000 U Heparin / mL Leitungswasser

Zellkulturmedien (vgl. **Tabelle 2-2**):

Tab. 2-2: Zusammensetzung der zur Herstellung der Zellkulturen benötigten Medien

	Calcium-Magnesium-freies (CMF) Medium, pH 7,5	Verdauungsmedium (VM), pH 7,5	Kulturmedium (minimal essential, ME-Medium)
Chemikalien	Molarität oder Menge	Molarität oder Menge	Molarität oder Menge
NaCl, Merck, Darmstadt	110 mM	110 mM	110 mM
KCl, Merck, Darmstadt	5,4 mM	5,4 mM	5,4 mM
CaCl ₂ *2H ₂ O, Merck, Darmstadt	---	1,86 mM	0,93 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O, Merck, Darmstadt	---	---	0,8 mM
Na ₂ HPO ₄ , Merck, Darmstadt	0,34 mM	0,34 mM	0,34 mM
KH ₂ PO ₄ , Merck, Darmstadt	0,44 mM	0,44 mM	0,44 mM
NaHCO ₃ , Merck, Darmstadt	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM
Hepes, Merck, Darmstadt	15 mM	15 mM	15 mM
Vitamine 100x, MEM essential vitamine mixture, BioWhittaker, Verviers, Belgien	---	---	10 mL / L
Aminosäuren 50x, MEM amino acid solution, PAN Biotech, Aidenbach	---	---	20 mL / L
Penicillin, BioWhittaker, Verviers, Belgien	10 000 U / 100 mL	10 000 U / 100 mL	10 000 U / 100 mL
Streptomycin, BioWhittaker, Verviers, Belgien	10 mg / 100 mL	10 mg / 100 mL	10 mg / 100 mL
NaEDTA, Serva, Heidelberg	5 mM	---	---
L-Glutamin, BioWhittaker, Verviers, Belgien	---	---	1 mM
Kollagenase (Collagenase D, 0,250 U / mg), Roche Diagnostics, Mannheim	---	40 mg	---

Durchführung der Zellkulturherstellung

Die Herstellung der primären Leberzellkulturen aus Lebern von *X. laevis* erfolgte nach der Methode von KLOAS ET AL. (1999). Adulte männliche Tiere wurden mit einer Überdosis MS-222 betäubt. Danach wurde ihnen 0,6 mL Heparinlösung injiziert, um die Blutgerinnung zu verhindern. Unter einer Sterilbank (Kendro, Rodenbach) wurde die Bauchhöhle und der Herzbeutel der Tiere geöffnet. Mit einer Kunststoffkanüle wurde ein Herzkatheder in den Vorhof des dreikammerigen Froschherzes gelegt. Dadurch wurde eine rückläufige Perfusion der Leber erreicht.

Zuerst wurde die Leber mit 125 mL CMF-Medium, das langsam aus einem Schütteltrichter durch einen Silikonschlauch in das Herz floss, durchgespült, um Blut und Ca^{2+} -Ionen zu entfernen. Danach folgte die Behandlung mit 125 mL Verdauungsmedium, das durch die enthaltene Kollagenase das Kollagen im Bindegewebe der Leber auflöste und schließlich wurde nochmals mit 100 mL CMF-Medium gespült, um die restliche Kollagenase und die Ca^{2+} -Ionen auszuwaschen.

Anschließend wurde die Leber herauspräpariert, in eine sterile Petrischale überführt und mit eiskaltem CMF-Medium überschichtet. Die Leberhälften wurden mit einer Rasierklinge zerkleinert und durch Filtration der Zellsuspension durch Gazenetze unterschiedlicher Maschenweite (250 μm bzw. 50 μm) wurden die Zellbestandteile endgültig von Geweberesten getrennt. Im Filtrat befanden sich somit noch Hepatocyten, Erythrocyten und Melanocyten. Um Erythrocyten und Melanocyten möglichst vollständig zu entfernen, wurden drei Zentrifugationen (Megafuge 1.0R, Kendro, Rodenbach) durchgeführt (700 g – 10 min, 500 g – 5 min, 300 g – 5 min). Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen und das Pellet wurde in CMF-Medium resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation erfolgte die Aufnahme der Zellen in ME-Medium, das jeweils vor Gebrauch neu angesetzt wurde. Alle eingesetzten Medien wurden steril filtriert.

Die Zellen wurden mit einer Zählkammer (Neubauer, Roth, Karlsruhe) unter einem Inversionsmikroskop (Axiovert 25, Carl-Zeiss Inc., Jena) gezählt und auf 10^6 Zellen / mL verdünnt. Der Vitalitätstest wurde stichprobenartig mit Trypan-Blau durchgeführt. Dabei färbten sich bei intakten Zellen die Zellmembranen blau, wohingegen tote oder geschädigte Zellen vollständig blau gefärbt erschienen, da ihre Zellmembran das Trypan-Blau nicht zurückhalten konnten. Zur Kultivierung der Zellen wurden Zellkulturschalen mit 24 Kavitäten (Falcon Primaria, Heidelberg) verwendet. Es wurden 500 μL Zellsuspension in jede Kavität gegeben, so dass ungefähr 500 000 Zellen darin vorhanden waren. Die Kulturplatten wurden in einen Brutschrank (Heraeus, Kendro, Rodenbach) überführt, in welchem sie sich zwei Stunden lang

bei 20 °C und hoher Luftfeuchtigkeit befanden, damit sich die Zellen absetzen und an die Oberfläche der Kulturschalen anheften konnten.

2.4.2.2 Behandlung der Zellkulturen

Bevor die Zellkulturen für das Screening von Umweltproben eingesetzt werden konnten, musste getestet werden, welche Kultivierungs- und Behandlungsgegebenheiten geeignet waren, um eine möglichst sensitive Antwort der Zellen auf eine Exposition mit ED zu erhalten.

Lösungen und Testsubstanzen

ME-Medium	s. 2.4.2.1
Ethanol 99 % p.a	Roth, Karlsruhe
E2	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
EE	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
BPA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tamoxifen (TAM)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
T	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Methyltestosteron (MT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Vinclozolin (VC)	Riedel-de-Haen, Seelze
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

Durchführung der Zellbehandlung

Zum Ermitteln des geeigneten Expositionszeitraumes wurden 28, 32 und 36 Stunden nach Beginn der Behandlung die Zellen entnommen. Als Testsubstanzen wurden jeweils die Lösungsmittelkontrolle (Ethanol 99 % p.a.) sowie E2, EE, DHT und T in den Konzentrationen 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-6} M eingesetzt. Die Auswertung der jeweiligen Biomarkerexpression ergab den geeigneten Kultivierungszeitraum und das geeignete Behandlungszeitintervall.

Zur Etablierung des RBP als neuem Biomarker wurden die Leberzellen mit folgenden Chemikalien behandelt, deren Strukturformeln die **Abbildung 2-3** zeigt (Strukturen für E2 und BPA vgl. **Abb. 2-1**):

- Östrogene Substanzen E2, EE und BPA;
- Antiöstrogene Substanz TAM;
- Androgene Substanzen T, DHT und MT;
- Antiandrogene Chemikalie VC.

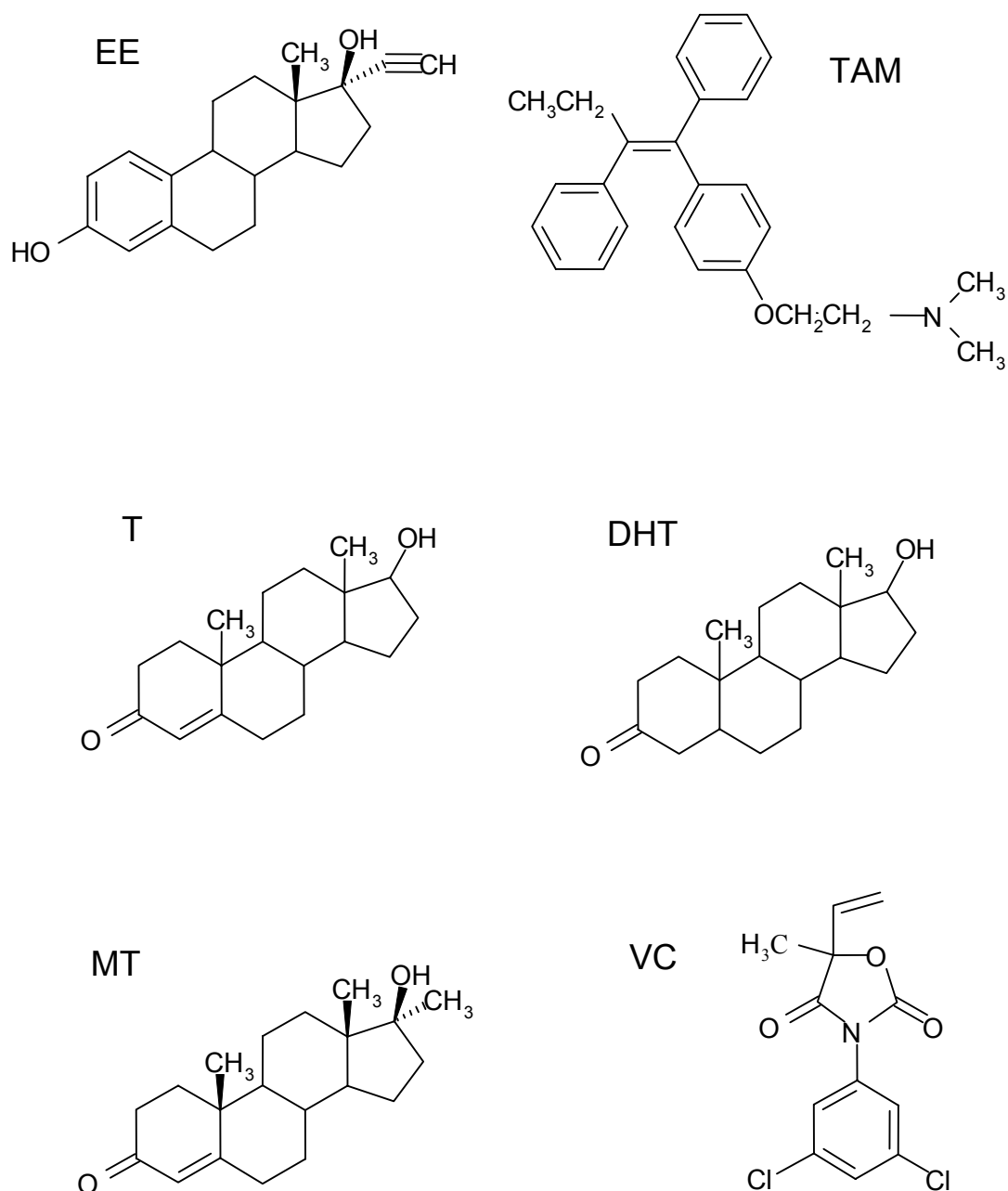


Abb. 2-3: Strukturformeln der in die Zellkulturen eingesetzten Testsubstanzen. EE: 17 α -Ethinylöstradiol, TAM: Tamoxifen, T: Testosteron, DHT: Dihydrotestosteron, MT: Methyltestosteron, VC: Vinclozolin.

Alle Substanzen wurden in Ethanol 99 % p.a. gelöst und es wurden jeweils 5 μ L Lösung einer Konzentrationsreihe der jeweiligen Substanz pro Kavität eingesetzt. Die Konzentrationsreihe umfasste Konzentrationen von 10^{-9} M bis 10^{-6} M. Die Chemikalien wurden sowohl einzeln als auch in bestimmten Kombinationen getestet. Dabei wurden jeweils T-, DHT-, MT- und

TAM-Konzentrationsreihen mit EE 10^{-6} M kombiniert. Weiterhin wurden Zellen mit DHT 10^{-6} M und einer VC-Konzentrationsreihe in Kombination behandelt. Für die jeweiligen Behandlungsansätze wurden die Kontrollkavitäten entsprechend mit einem höheren Volumen Lösungsmittel versetzt (10 μ L). Ebenso wurden die Positivkontrollen (EE 10^{-6} M bzw. DHT 10^{-6} M) zusätzlich mit 5 μ L Ethanol versetzt, um ebenfalls das Endvolumen von 10 μ L in den Kombinationsexperimenten zu erreichen.

Zum Screening der Extrakte der Gewässerproben wurden die Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle (Ethanol), den Positivkontrollen (EE 10^{-6} M und DHT 10^{-6} M) sowie den Extrakten der Gewässerproben behandelt. Diese wurden unverdünnt, 1 : 2, 1 : 5 und 1 : 10 verdünnt eingesetzt. Alle Behandlungen erfolgten als Doppelansatz in jeweils drei separaten Zellkulturen.

Aus den Vorversuchen ging hervor, dass die Zellen am empfindlichsten reagierten, wenn die erste Chemikalienzugabe erfolgte, nachdem die Zellen zwei Stunden zum Absetzen im Brutschrank gestanden hatten. Danach fand alle 12 Stunden ein Mediumswechsel und eine erneute Chemikalienzugabe statt. Beim Mediumswechsel wurde das ME-Medium in den Kavitäten vollständig mit einer Pipette abgezogen. Dann wurden vorsichtig 500 μ L Medium hinzugegeben, die wiederum vollständig entnommen wurden. Schließlich wurden nochmals 500 μ L ME-Medium in die Kavitäten gegeben. Durch diese Vorgehensweise sollte ein möglichst vollständiger Austausch des Mediums gewährleistet werden. Nach dem Mediumwechsel fand die Chemikalienzugabe statt und die Zellen kamen für weitere 12 Stunden in den Brutschrank. Nach 36 Stunden wurde der Versuch beendet. Das Medium wurde vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 500 μ L Trizol resuspendiert und in sterile 2 mL Eppendorfgefäße mit flachem Boden überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die Zellen bei -70°C aufbewahrt werden.

2.4.2.3 Aufarbeitung der behandelten Hepatocyten

Lösungen und Chemikalien

<i>Taq</i> -Polymerase	Amersham, Freiburg
PCR-Puffer (pH 9)	Amersham, Freiburg
Zusammensetzung:	
KCl	500 mM
MgCl ₂	15 mM
Tris-HCl	100 mM

RBP-Primer

TipMOL, Berlin

Sequenz forward: 5'-ATTAATTGCCTTGGGGTTCC-3'

Sequenz reverse: 5'-TGGCTAGAGCCCCATGATAC-3'

Durchführung der Aufarbeitung

Aus den Leberzellen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Das Durchführungsprotokoll entsprach dem in Kapitel 2.2.4.2 beschriebenen bis auf eine zusätzliche Zentrifugation der Proben. Die beim Homogenisieren der Zellen freigesetzten Pigmentmoleküle aus den Melanocyten, die bei der Zellkulturherstellung nicht vollständig entfernt werden konnten, beeinflussten den Reinheitsgrad der RNA. Eine nützliche Lösung dieses Problems war, nach der Homogenisierung der Zellen 5 min bei 10 000 g zu zentrifugieren. Danach wurde der Überstand von den Pigmenten getrennt und in ein neues Gefäß überführt, in dem dann die RNA-Fällung stattfand.

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte gemäß Kapitel 2.2.4.3. Die Amplifikation des ER aus den Zellen erforderte eine Änderung der Annealing-Temperatur. Diese musste auf 65 °C angehoben werden, da eine andere *Taq*-Polymerase verwendet wurde, die ein höheres Temperaturoptimum aufwies. Ansonsten wurden die PCR-Protokolle für den ER und den EF als internen Standard wie in Kapitel 2.2.4.4 verwendet.

Zur Amplifikation des RBP wurde ein spezifischer Primer synthetisiert. Es wurden 3 µL cDNA-Lösung eingesetzt und ein Premix zu jeder Probe dazu gegeben, der aus 18,7 µL PCR-Wasser, 2,5 µL PCR-Puffer, 0,2 µL dNTPs, 0,2 µL Primer forward, 0,2 µL Primer reverse und 0,2 µL *Taq*-Polymerase bestand. Die Amplifikation wurde gestartet, indem das Gemisch im Thermocycler auf 94 °C erhitzt wurde. Daraufhin folgten 23 Zyklen dreier Temperaturschritte (94 °C – 1 min, 62 °C – 1 min, 72 °C – 1 min). Das Programm endete nach einer zweiminütigen Phase bei 72 °C und anschließender Abkühlung auf 10 °C. Alle PCR-Durchläufe wurden doppelt angesetzt.

Die Amplifikation der RBP-mRNA ergab ein PCR-Produkt mit einer Länge von 323 bp. Die Auftrennung und Färbung der Produkte sowie die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.5 beschrieben. Eine Sequenzierung der erhaltenen Produkte bestätigte die Übereinstimmung mit der RBP-Sequenz für *Xenopus laevis* (Seqlab, Göttingen).

2.5 STATISTIK

Die statistische Analyse der Daten hinsichtlich signifikanter Unterschiede wurde mit der statistischen Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 9.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Dabei kamen zur Analyse der BPA-Ergebnisse als Testverfahren der Kruskal-Wallis-Test (KRUSKAL & WALLIS 1952) sowie der Mann-Whitney U-Test (WEBER 1986) zur Anwendung. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde geprüft, ob die Wertegruppen einer Grundgesamtheit entstammten, damit ein Vergleich zweier Gruppen auf signifikante Unterschiede gerechtfertigt werden konnte. Zwei Gruppen wurden daraufhin mit dem parameterfreien Mann-Whitney U-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Als Signifikanzniveau (p) wurde in der Regel $p < 0,05$ definiert, bei Bedarf erfolgte eine Gewichtung der signifikanten Unterschiede durch Signifikanzniveauintervalle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$).

Die statistische Analyse der Zellkulturansätze erfolgte nach dem Wilcoxon-Test für gepaarte Werte (VAN DER WAERDEN 1969), um signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungen und den (Positiv)kontrollgruppen festzustellen.

3 ERGEBNISSE

3.1 *IN VIVO*-EXPOSITION VON KAULQUAPPEN

Die Wirkungen von ED auf den sich entwickelnden Gesamtorganismus ließen sich durch Expositionsexperimente nachweisen. Bei der Larvalentwicklung von *Xenopus laevis* ist die Geschlechtsentwicklung von den Sexualsteroiden abhängig. Durch die Bestimmung des Geschlechterverhältnisses der Tiere nach der Metamorphose konnte die Wirkung verschiedener Substanzen nachgewiesen werden (WITSCHI & ALLISON 1950; KLOAS 2002; BÖGI ET AL. 2002).

In der vorliegenden Arbeit beschränkten sich die Expositionsexperimente auf die Untersuchung der bekannten östrogen wirksamen Chemikalie Bisphenol A. Da bereits in einem anderen Zusammenhang die verweiblichenden Effekte dieser Substanz in Expositionsversuchen gezeigt wurden (KLOAS ET AL. 1999), konnte auf diese Erkenntnisse aufgebaut werden. Eine umfassende Studie der Wirkungen verschiedener BPA-Konzentrationen sowie des Abbauverhaltens von BPA im Expositionsansatz wurden durchgeführt. Als Positivkontrolle diente E2, das in zahlreichen Versuchen unserer Arbeitsgruppe als konstant verweiblichende Chemikalie wirkte.

3.1.1 Wirkungen von BPA auf die Sexualdifferenzierung von *Xenopus laevis*

BPA wurde in zwei Expositionsversuchen getestet. Im ersten Versuch wurde zum Standardmedium 10^{-7} M und 10^{-8} M E2 in die Becken der Positivkontrolle und 10^{-7} M und 10^{-8} M BPA in die Behandlungsbecken gegeben. In vorangegangenen Testdurchgängen der Experimente waren keine Schädigungen der Tiere durch die zugegebenen Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen festgestellt worden. Die Sterberate der Kaulquappen wurde in jedem Becken dahingehend untersucht, ob sie sich signifikant von derjenigen anderer Becken unterschied. Dies konnte ausgeschlossen werden, so dass kein Zusammenhang zwischen Sterberate und Behandlung der Tiere gefunden wurde. Daraufhin wurden Tiere aus Becken gleicher Behandlung zur Auswertung zusammengeführt. Der relative Anteil der toten Tiere während dieses Expositionsexperiments lag in allen Becken zwischen 20 und 30 %.

Von den überlebenden Tieren vervollständigten mindestens 75 % die Metamorphose. Es konnten aus jedem Behandlungsbecken Tiere entnommen werden, die vorzeitig die Metamorphose beendet hatten, so dass kein Zusammenhang zwischen Behandlung und Entwicklungsdauer festzustellen war. Die vollständig entwickelten Frösche sowie Kaulquappen ab dem Entwicklungsstadium 56 wurden nach Beendigung des Experiments der Auswertung zugeführt. Die Ungleichverteilung der gestorbenen sowie der unterentwickelten Tiere in den einzelnen Becken erklärt die Varianz der Stichprobenanzahl (n) in **Abbildung 3-1**.

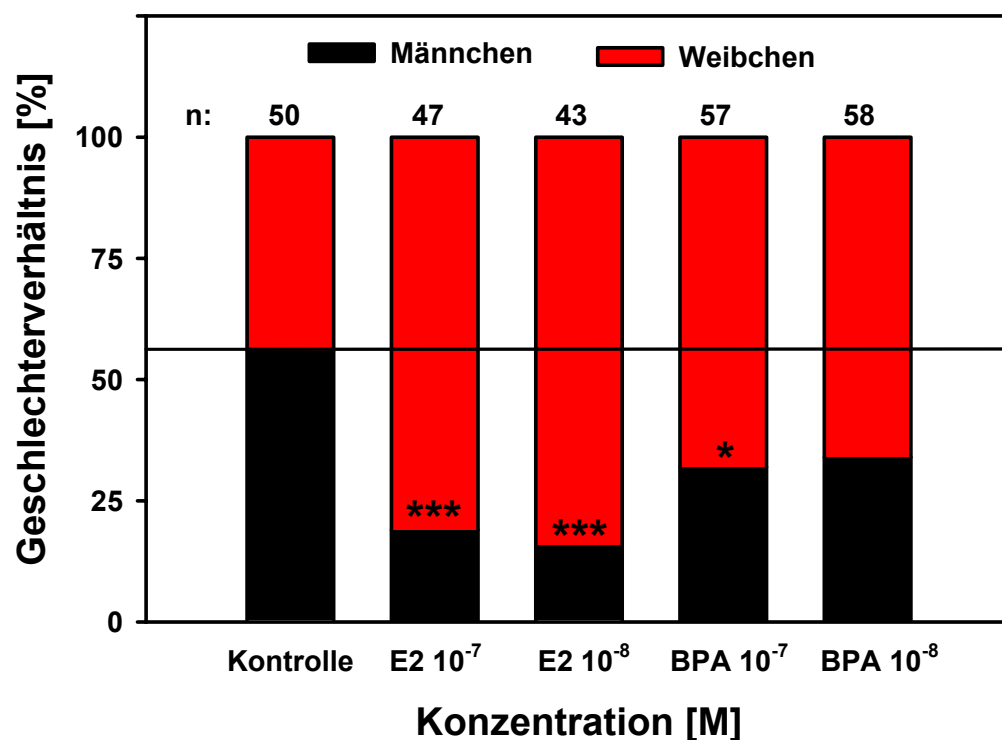


Abb. 3-1: Prozentuale Verteilung der Geschlechter in den unterschiedlichen Kontroll- und Behandlungsgruppen (17 β -Östradiol (E2) und Bisphenol A (BPA) jeweils 10^{-7} M und 10^{-8} M). Die schwarze Linie unterteilt die Graphik in die Anteile der Männchen und Weibchen der Kontrollgruppe. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$). Die Stichprobenanzahl (n) ist angezeigt.

Die Auswertung des ersten Expositionsexperiments ergab, dass das Geschlechterverhältnis der Tiere des Kontrollbeckens einen leicht erhöhten Männchenanteil aufwies (56 % Männchen zu 44 % Weibchen). Die Frösche der Positivkontrollen zeigten eine signifikante Erhöhung ($p < 0,001$) des

Weibchenanteils im Vergleich zur Kontrolle, sowohl bei Behandlung mit 10^{-7} M als auch mit 10^{-8} M E2 (81 % bzw. 84 %). Der Weibchenanteil (69 %) der Tiere, die mit BPA behandelt wurden, war bei einer Konzentration von 10^{-7} M signifikant erhöht ($p < 0,05$), wobei dieser weniger stark ausgeprägt war als bei gleicher E2-Konzentration. 10^{-8} M BPA wirkte nicht signifikant verweiblichend. Dennoch erzeugte diese Konzentration einen Weibchenüberschuss (65 %) im Vergleich mit der Kontrolle (**Abb. 3-1**).

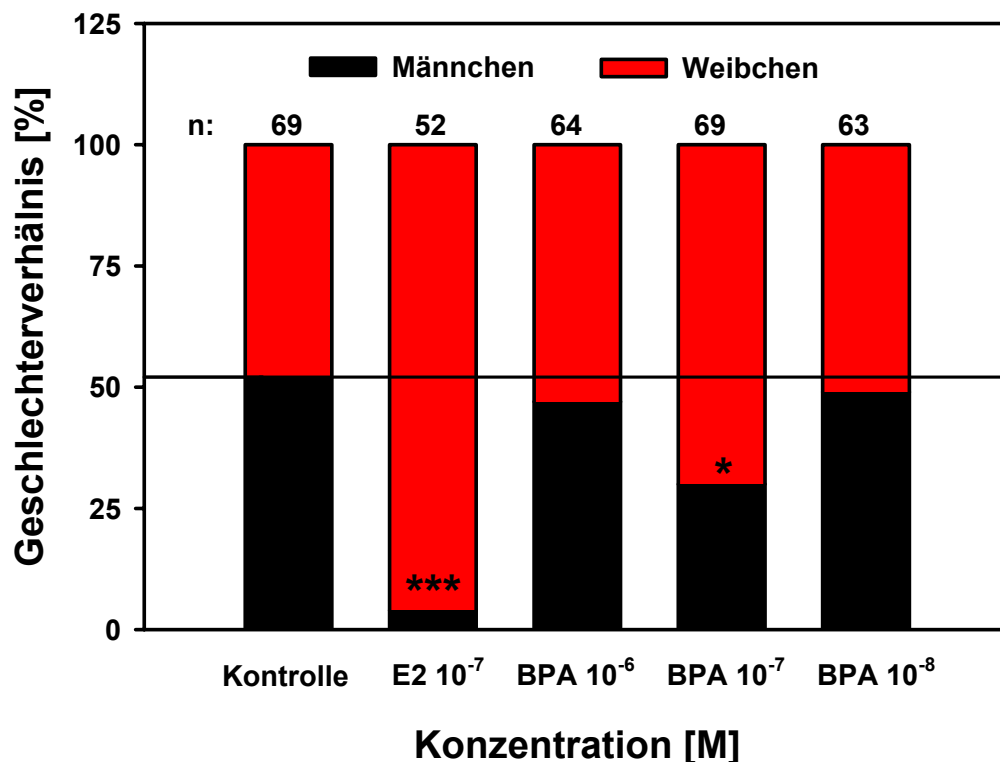


Abb. 3-2: Prozentuale Verteilung der Geschlechter in den unterschiedlichen Kontroll- und Behandlungsgruppen (17 β -Östradiol (E2) 10^{-7} M und Bisphenol A (BPA) 10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M). Die schwarze Linie unterteilt die Graphik in die Anteile der Männchen und Weibchen der Kontrollgruppe. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle (***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$). Die Stichprobenanzahl (n) ist angezeigt.

Die Ergebnisse des zweiten Expositionsansatzes stellt **Abbildung 3-2** dar. Unterschiede zum ersten Ansatz bestanden darin, dass als Positivkontrolle nur 10^{-7} M E2 eingesetzt wurde. Die Behandlung mit BPA erfolgte in drei Konzentrationen (10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M) und die Tiere wurden nach Beendigung der Metamorphose gewogen, um einen möglichen Einfluss der

Chemikalienzugabe auf einen Wachstumsparameter (Körpergewicht) festzustellen (**Abb. 3-3**).

Die Sterberate im zweiten Expositionsansatz war im Vergleich zum ersten geringer (10 – 20 %). Mindestens 75 % der überlebenden Tiere beendeten den Metamorphoseprozess. Eine statistische Untersuchung der Anzahl der gestorbenen oder unterentwickelten Tiere in den jeweiligen Testbecken ergab keine Signifikanzen hinsichtlich der Behandlung. Folglich wurden parallele Behandlungsgruppen in der Auswertung zusammengeführt. Die Ungleichverteilung der Stichprobenanzahl (n) ist wiederum auf die unterschiedlich hohen Sterbe- und Entwicklungsraten in den einzelnen Becken zurückzuführen.

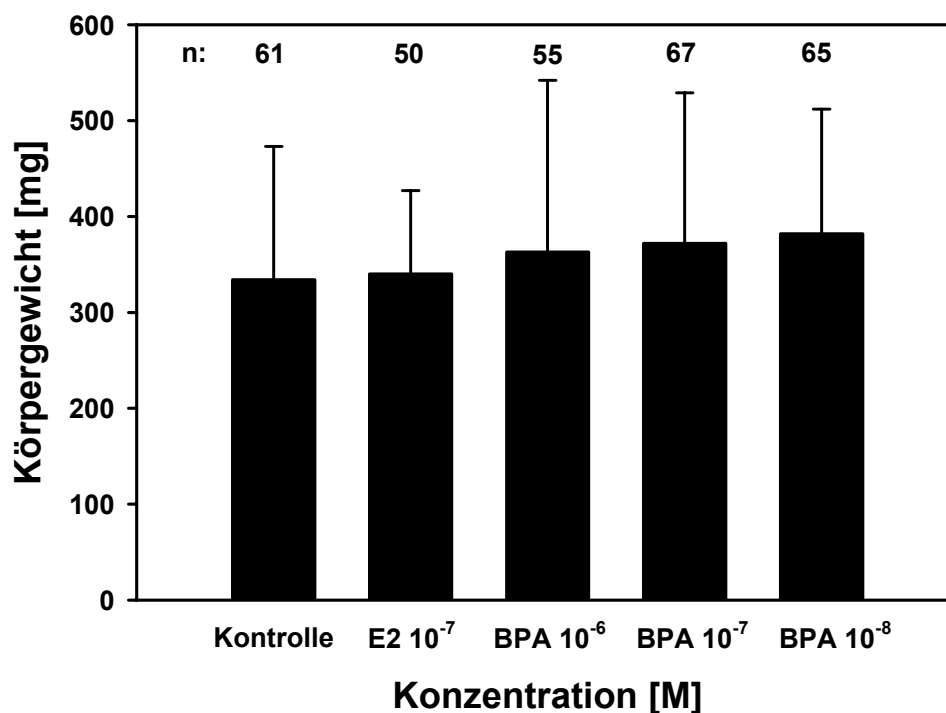


Abb. 3-3: Mittleres Körpergewicht der juvenilen Frösche unmittelbar nach Abschluss der Metamorphose. Die unterschiedliche Anzahl der Stichproben (n) erklärt sich aus der unterschiedlich hohen Sterbe- und Entwicklungsraten in den einzelnen Becken. Das Körpergewicht wurde als Lebendgewicht gemessen, die Standardabweichungen sind angezeigt.

Im zweiten Expositionsansatz konnte ein leicht erhöhter Männchenanteil (52 %) in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Behandlung der Tiere mit 10^{-7} M E2 führte zu einem Weibchenanteil von 96 %. Dieser war signi-

fikant verschieden von der Kontrollgruppe. Bei den verschiedenen BPA-Behandlungen zeigten zwei Gruppen keine Verweiblichungseffekte (10^{-6} M: 47 % Hoden und 53 % Ovarien; 10^{-8} M: 49 % Hoden und 51 % Ovarien). Die zwischen diesen beiden Konzentrationen liegende BPA-Konzentration (10^{-7} M) verursachte wie im ersten Expositionsversuch einen signifikant erhöhten Weibchenanteil (70 %, **Abb. 3-2**).

Das durchschnittliche Gewicht der Frösche aus den einzelnen Behandlungsgruppen unterschied sich im statistischen Vergleich nicht signifikant voneinander. Tiere der Kontroll- und der E2-Behandlungsgruppen wiesen ein ähnliches durchschnittliches Körpergewicht nach der Metamorphose auf (334 mg bzw. 340 mg). Alle drei BPA-Behandlungsgruppen (10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M) zeigten ein erhöhtes durchschnittliches Körpergewicht der Tiere (363 mg, 372 mg und 382 mg) verglichen mit den Kontroll- und E2-Gruppen (**Abb. 3-3**).

3.1.2 Wirkungen von BPA auf die Gonadenentwicklung

Durch das Fixieren der Gonaden wurde die Struktur der Hoden oder Ovarien deutlich sichtbar gemacht, so dass Entwicklungsstörungen des gesamten Organs beobachtet werden konnten. In keinem der untersuchten Tiere wurde eine oberflächliche Fehlentwicklung der Gonaden festgestellt. Es ließen sich jedoch kleinere Unterschiede in der Größe der jeweiligen Gonaden beobachten, die grundsätzliche Gestalt der jeweiligen Geschlechtsorgane änderte sich allerdings nicht. Sämtliche Tiere wiesen die typischen morphologischen Merkmale der entsprechenden Gonaden auf.

Die Hoden lagen bei ventraler Betrachtung dem kopfnahen Drittel der Nieren auf und zeigten sich nach Fixierung als einheitliches weißes Gewebe, das am unteren Ende spitz zulief (**Abb. 3-4, B**). Die Ovarien zeigten eine schwammartige, gelappte Struktur, die sich über den gesamten Nierenbereich ausbreitete und mit schwarzen Punkten durchsetzt war. Dabei handelt es sich um eingelagerte Melanocyten, die ausschließlich in den Ovarien auftreten und den Hoden fehlen (**Abb. 3-4, A**).

Die Betrachtung der Gonaden hinsichtlich morphologischer Auffälligkeiten ließ keine Rückschlüsse auf fehlerhafte Entwicklungen auf zellulärer Ebene zu. Eine Untersuchung der Zellstrukturen in den Geweben sollte hierüber Auskunft geben. Auf Grund der Tatsache, dass die Testsubstanz BPA verweiblichend wirkt, wurden systematisch die Hoden der männlichen Tiere

des zweiten Expositionsansatzes histologisch untersucht. Bis auf zwei der untersuchten histologischen Präparate zeigten alle anderen Schnitte eine einheitliche Struktur. Dabei konnten die typischen zellulären Bestandteile eines Hodens identifiziert werden (Tubuli seminiferi mit Sertoli-Zellen und verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimzellen, glatte Muskelzellen und Leydigische Zellen in den Lymphräumen), wobei teilweise Unterschiede im Entwicklungszustand vorlagen (**Abb. 3-5, C**).

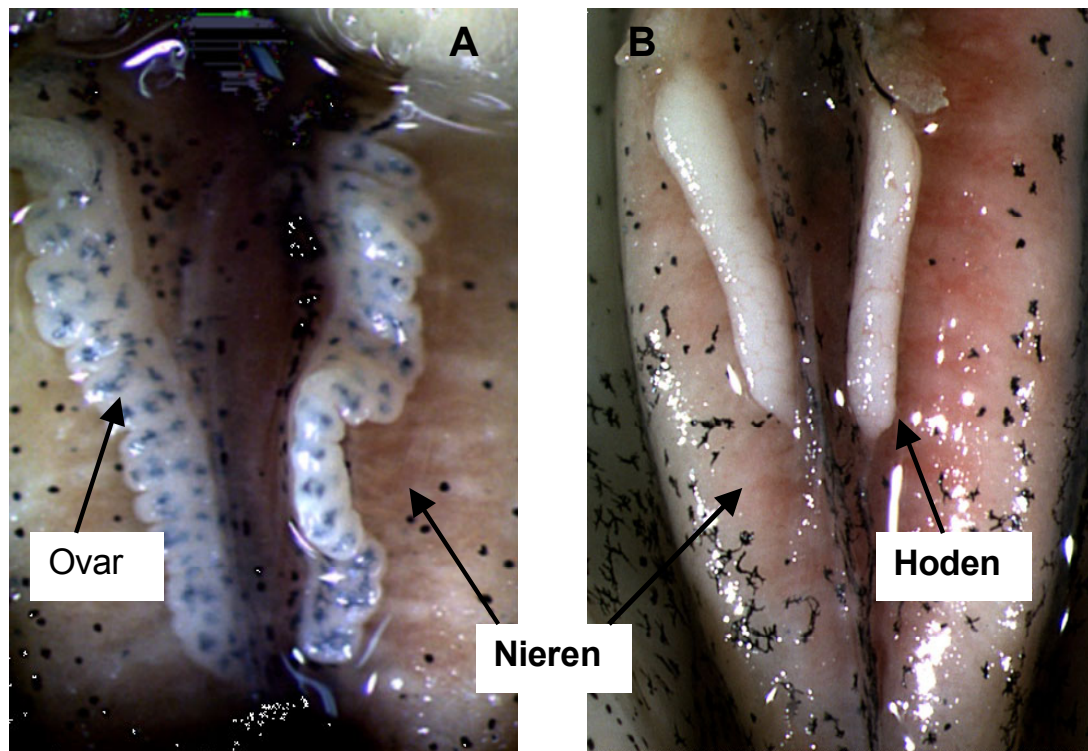


Abb. 3-4: Morphologie von Gonaden der juvenilen Frösche. Bild **A** zeigt ein typisches Beispiel eines Ovarien-Nieren-Komplexes, Bild **B** stellt einen typischen Hoden-Nieren-Komplex dar. Die Fixierung erfolgte mit Bouin-Lösung, die Vergrößerung ist 60 x.

Bei den beiden Ausnahmen handelte es sich um Tiere aus den 10^{-8} M BPA-Behandlungsbecken. Es wurden jeweils Oocyten im Hodengewebe entdeckt. Diese Fehlentwicklung ließ sich auf Grund der geringen Häufigkeit nicht statistisch mit der Behandlung korrelieren, so dass im vorliegenden Fall von zufälligem Auftreten ausgegangen werden musste (**Abb. 3-5, B**).

Es wurden stichprobenhaft histologische Präparate von Ovarien angefertigt, um die normale zelluläre Entwicklung zu überprüfen. In den untersuchten Schnitten der weiblichen Geschlechtsorgane wurden keine Fehlentwicklungen erkannt und alle Exemplare zeigten die typischen Zellen eines

Ovars (verschiedene Entwicklungsstadien der Ovarialfollikel, Bindegewebe mit endokrinen Zellen, **Abb. 3-5, A**).



Abb. 3-5: Drei histologische Präparate unterschiedlicher Gonaden. **A:** Schnitt durch ein Ovar. Die unterschiedlichen Reifestadien der Follikel sind zu erkennen. **B:** Schnitt durch eine Zwittergonade. Im Hodengewebe liegen deutlich sichtbar zwei Oocyten. **C:** Schnitt durch einen Hoden. Tubuli seminiferi sowie Muskel- und Leydigsche Zellen sind erkennbar. Die Färbung erfolgte mit Mayers Hämatoxylin-Eosin, die Vergrößerung ist 200 x.

3.1.3 Nachweis der ER-mRNA-Expression in Kaulquappen nach kurzzeitiger Behandlung mit BPA

Die Feststellung, dass BPA die Ausbildung weiblicher Geschlechtsorgane induzieren kann, lässt keine Aussage über den Wirkmechanismus dieser Substanz zu. Aus diesem Grund wurden Kaulquappen während der für die Sexualdifferenzierung sensiblen Entwicklungsphase (ab Stadium 50) zwei Wochen lang sowohl mit der wirksamsten BPA-Konzentration (10^{-7} M) als auch in einem Positivkontrollbecken mit der entsprechenden E2-Konzentration behandelt. Diesem Versuchsansatz lag die Vermutung zu Grunde, dass BPA seine Wirkung über eine Bindung an den ER vermittelt.

Die Untersuchung dieser Hypothese erfolgte, indem gezeigt wurde, dass BPA die Genexpression eines bestimmten östrogenen Biomarkers induzieren kann und dass dessen Expression durch den Liganden-Rezeptor-Transkriptionskomplex reguliert wird. Die Voraussetzungen für einen östrogenen Biomarker erfüllt in Kaulquappen der ER selbst, da eine Erhöhung der ER-Synthese durch den ER selbst induziert wird (RABELO & TATA 1993).

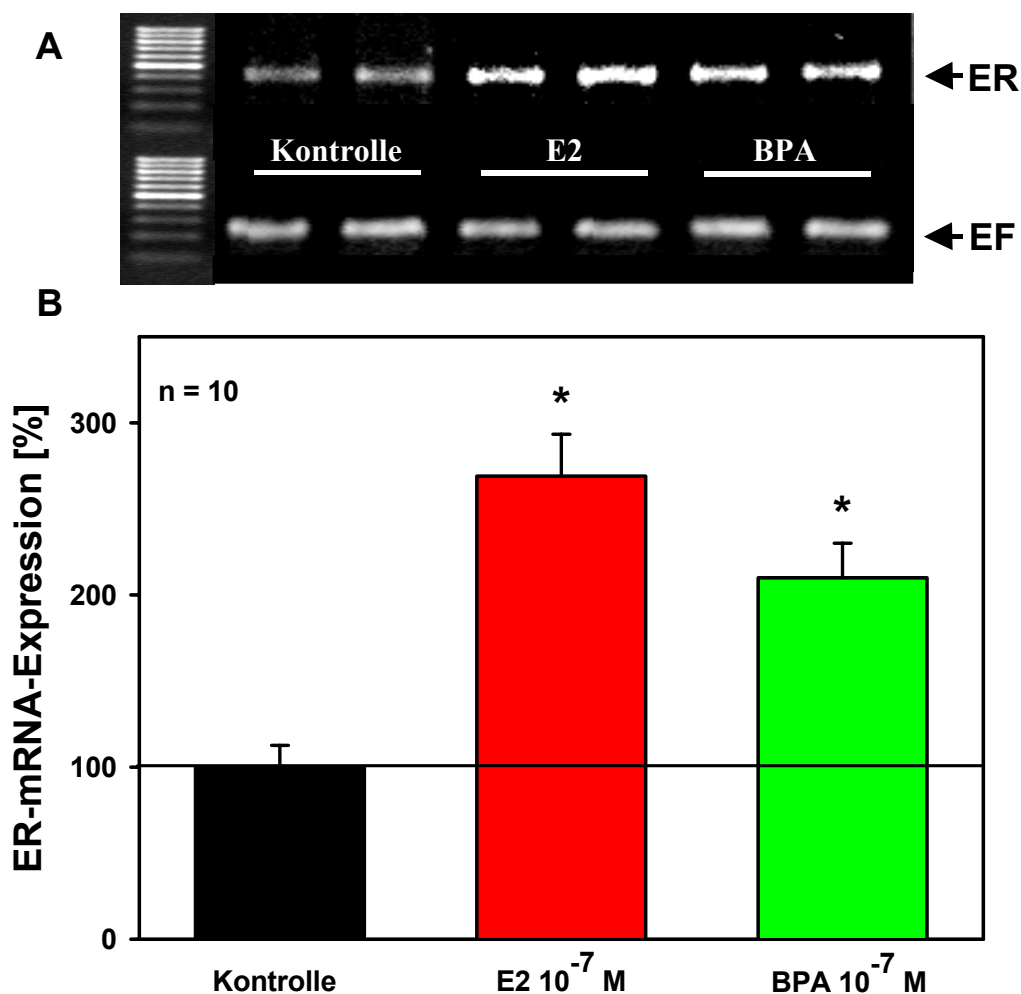


Abb. 3-6: ER-mRNA-Expression in Kaulquappen nach kurzzeitiger Behandlung (14 Tage) mit BPA und E2 (jeweils 10^{-7} M). Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$), Standardabweichungen sind angezeigt.

Im Vergleich mit der Expression in der Lösungsmittelkontrollgruppe wurde die mRNA-Expression des ER durch E2 um das 2,7-fache und durch BPA um das 2,1-fache erhöht. Diese Erhöhung erwies sich jeweils als statistisch signifikant ($p < 0,05$). **Abbildung 3-6, A** zeigt einen Ausschnitt eines Agarosegels mit den entsprechenden PCR-Produkten des ER und des internen Standards EF. Die Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen Analyse der PCR-Produkte erfolgte in mittleren Relativwerten. Die Expression des ER in der Kontrolle wurde dabei als 100 %-Wert definiert (**Abb. 3-6, B**).

3.1.4 Nachweis von BPA in den Expositionsversuchen

Im zweiten Expositionsansatz wurde BPA in drei Konzentrationen eingesetzt (10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M). Mit Hilfe von Wasserproben, die direkt nach der Chemikalienzugabe bzw. vor dem Wasserwechsel (48 Stunden später) genommen wurden, sollte zum einen gezeigt werden, ob sich die Nominalkonzentration in den Testbecken wiederfinden ließ und zum anderen, wie viel BPA nach zwei Tagen noch in den Becken zu finden war.

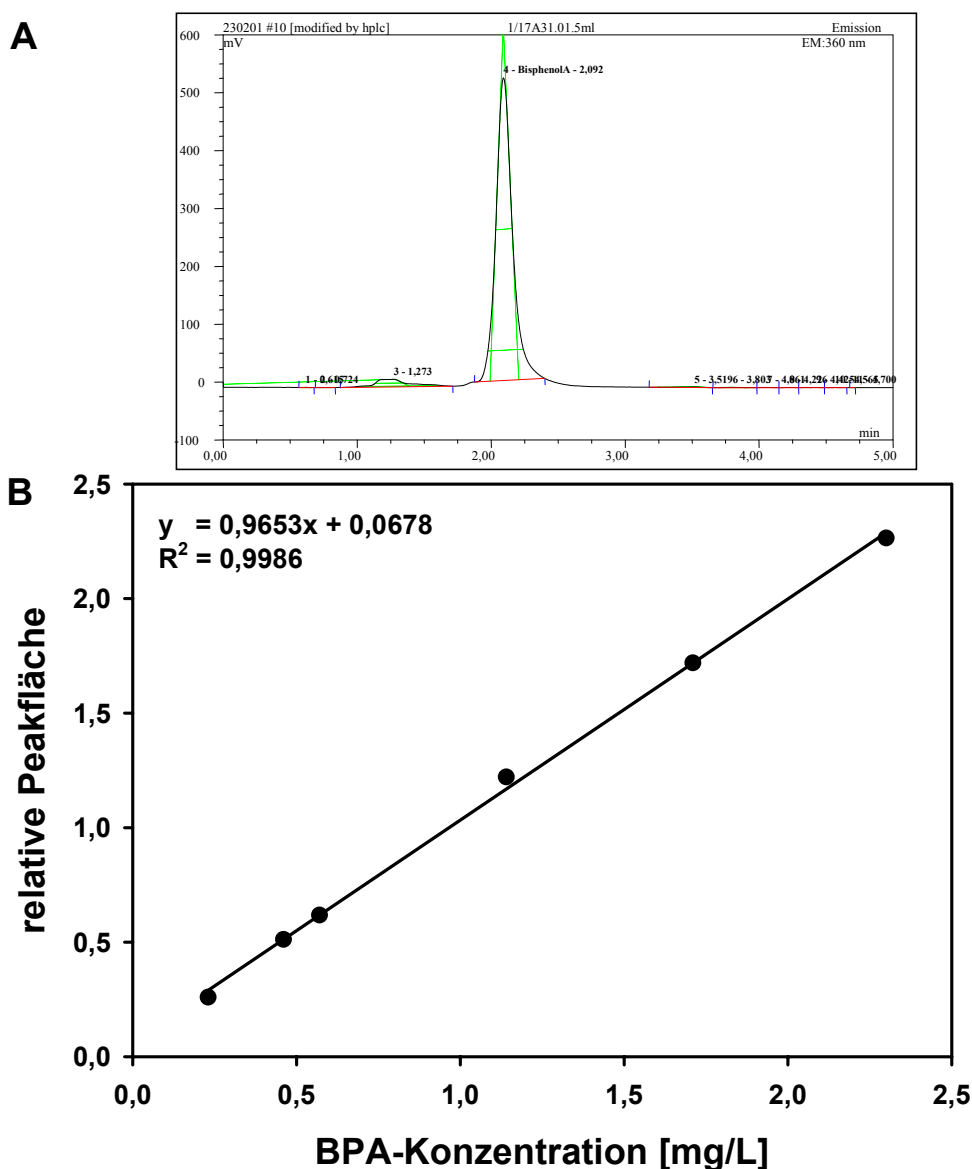


Abb. 3-7: Ausgewählter BPA-Peak als Ergebnis einer BPA-Analyse mittels HPLC (**A**) und eine Kalibrierkurve für die BPA-Quantifizierung (**B**). Kalibrierungsfunktion und Korrelationskoeffizient (R^2) sind angegeben. Die Angabe der BPA-Konzentration ist als mg / L des Lösungsmittels zu verstehen.

Als Grundlage für den analytischen Nachweis von BPA wurde eine chemische Analysemethode, die auf HPLC-Trennung beruhte, entwickelt (vgl. Kapitel 2.2.5). Es wurde eine Kalibrierkurve erstellt, um die Quantifizierung des BPA-Gehaltes in den Wasserproben zu gewährleisten (**Abb. 3-7**). Weiterhin wurden die Wiederfindungsrate und die Nachweisgrenze von BPA bestimmt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von BPA lag bei 92 % und die Nachweisgrenze bei 200 ng / L. Die Berechnungen erfolgten nach (FUNK ET AL. 1992).

In Wasser aus den Kontroll- bzw. Positivkontrollbecken konnte kein BPA nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der Wasserproben aus den BPA-Becken ergaben bei jeder Konzentration zu Beginn der Behandlung, dass 90 – 105 % der Nominalkonzentration vorhanden waren. Nach 48 h ließen sich jeweils 15 – 30 % der eingesetzten BPA-Konzentrationen nachweisen (**Abb. 3-8**).

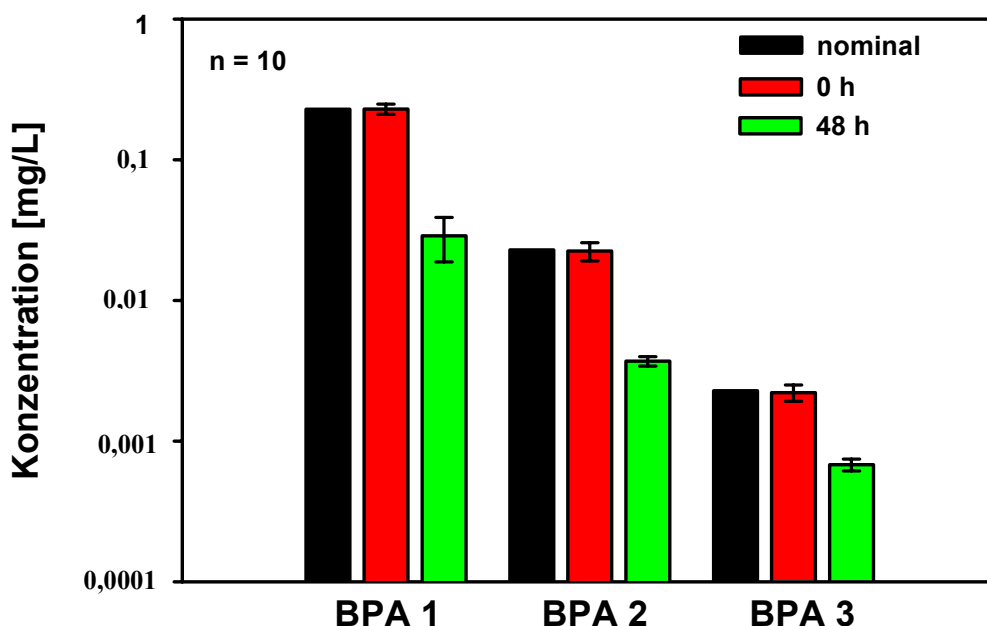


Abb. 3-8: Analyse der BPA-Konzentration zu Beginn der Behandlung und nach 48 h. Zum Vergleich ist die Nominalkonzentration dargestellt. BPA 1 = 10^{-8} M (= 2,23 $\mu\text{g} / \text{L}$) , BPA 2 = 10^{-7} M (= 22,3 $\mu\text{g} / \text{L}$), BPA 3 = 10^{-6} M (= 223 $\mu\text{g} / \text{L}$). Stichprobenanzahl (n) und Standardabweichungen sind angegeben.

Weiterhin wurden Messungen der BPA-Konzentration in Intervallen von 6 Stunden (48 h) durchgeführt, im Zeitraum zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wasserwechseln. Die Wasserproben stammten aus drei verschiedenen Behandlungsbecken, nämlich aus Becken, die nur BPA und Standardmedium beinhalteten (A). Weiterhin aus Becken, die BPA, Standardmedium und Futter enthielten (B) sowie aus Becken des Expositionsansatzes, in denen sich BPA, Standardmedium, Futter und Kaulquappen befanden (C). Alle drei Ausgangskonzentrationen von BPA (10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M) wurden jeweils in den drei Behandlungsbecken eingesetzt.

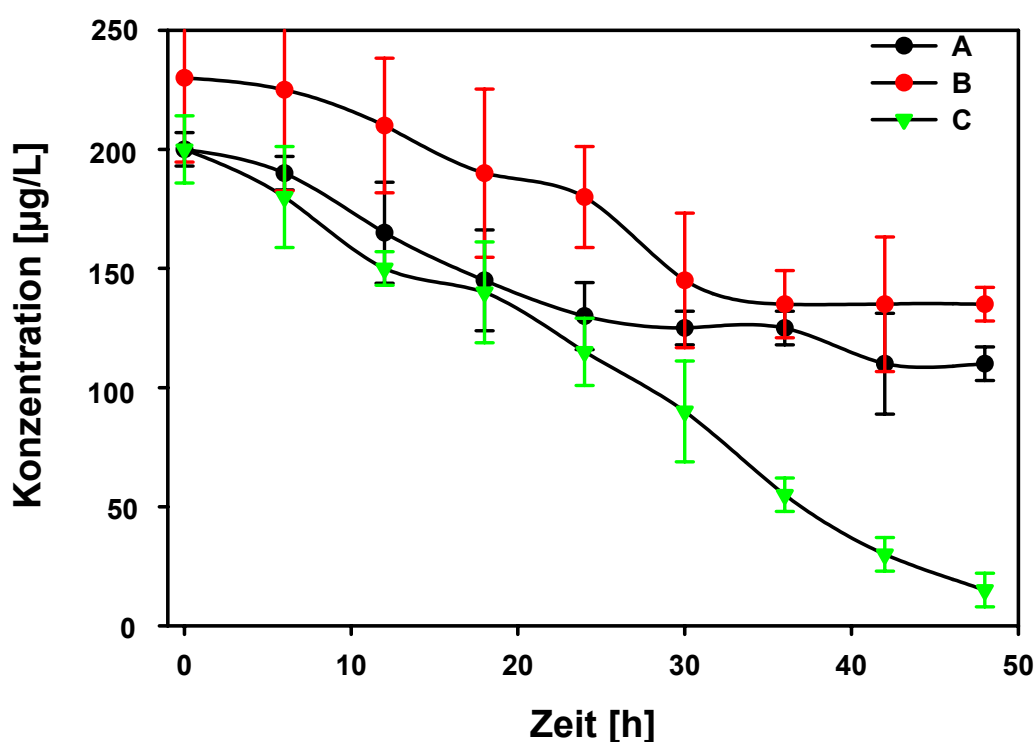


Abb. 3-9: Zeitverlauf der BPA-Konzentration in Proben aus drei verschiedenen Behandlungsbecken. Nominalkonzentration 10^{-6} M. Behandlung A: Standardmedium und BPA. Behandlung B: Standardmedium, Futter und BPA. Behandlung C: Standardmedium, Futter, Kaulquappen und BPA. Die Linien stellen den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar. Standardabweichungen sind angezeigt, die Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Probennahmen.

Die Messung der BPA-Konzentration in den einzelnen Ansätzen ergab, dass BPA im reinen Standardmedium nach 48 h noch mit mindestens 70 % der Nominalkonzentration nachgewiesen werden konnte. Ähnlich verhielt es sich mit der Behandlung B, in der ebenfalls 70 % der Nominalkonzentration gefunden wurde. Lediglich bei 10^{-8} M BPA sank die Konzentration auf unter 50 % der Nominalkonzentration. Wie erwartet und aus den vorherigen Analysen schon bekannt, enthielten die Wasserproben aus Becken mit der tatsächlichen Expositionszusammensetzung nach 48 h nur noch 15 – 30 % BPA (**Abb. 3-9, 3-10, 3-11**).

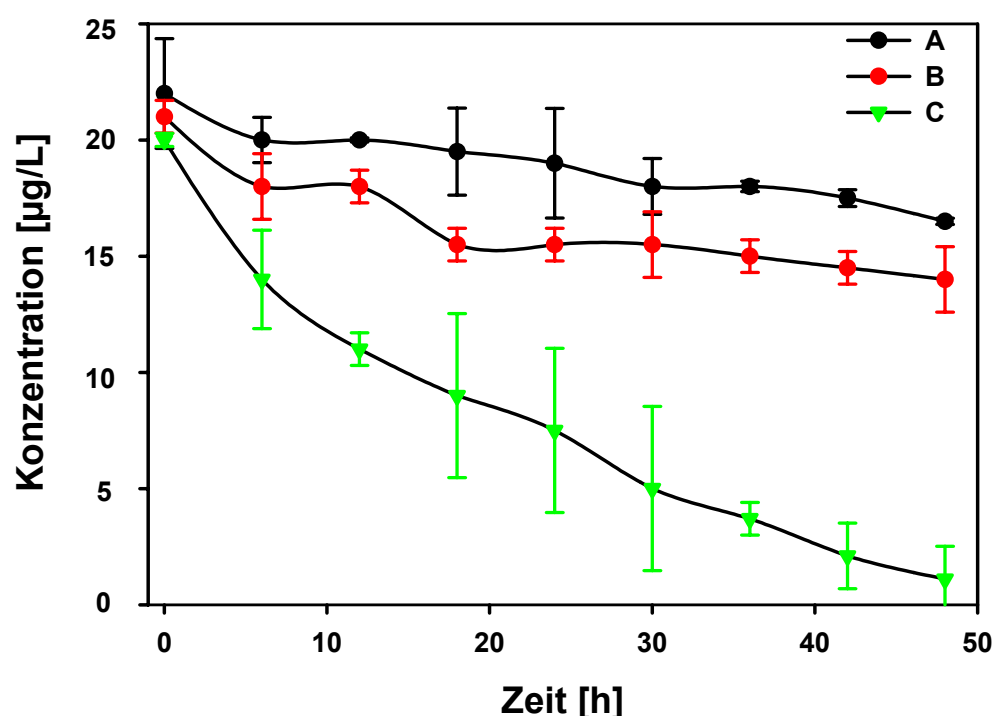


Abb. 3-10: Zeitverlauf der BPA-Konzentration in Proben aus drei verschiedenen Behandlungsbecken. Nominalkonzentration 10^{-7} M. Behandlung A: Standardmedium und BPA. Behandlung B: Standardmedium, Futter und BPA. Behandlung C: Standardmedium, Futter, Kaulquappen und BPA. Die Linien stellen den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar. Standardabweichungen sind angezeigt, die Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Probennahmen.

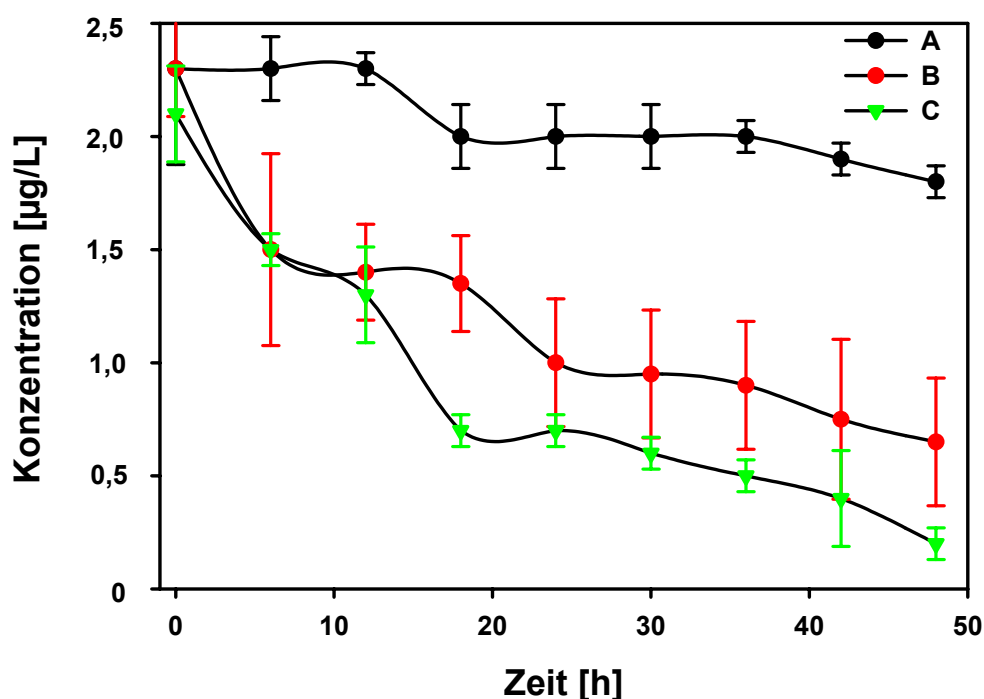


Abb. 3-11: Zeitverlauf der BPA-Konzentration in Proben aus drei verschiedenen Behandlungsbecken. Nominalkonzentration 10^{-8} M. Behandlung A: Standardmedium und BPA. Behandlung B: Standardmedium, Futter und BPA. Behandlung C: Standardmedium, Futter, Kaulquappen und BPA. Die Linien stellen den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar. Standardabweichungen sind angezeigt, die Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Probennahmen.

3.1.5 Nachweis von BPA in Umweltproben

Da in Umweltproben eine Vielzahl von chemischen Verbindungen vorliegt, konnte BPA nicht mittels HPLC-Technik nachgewiesen werden. Es wurde eine alternative Analysemethode entwickelt, die auf der Trennung und Konzentrationsbestimmung mittels GC / MS beruhte. Dazu war es wiederum erforderlich, eine Kalibrierkurve zur Quantifizierung von BPA zu erstellen (**Abb. 3-12**) und die Wiederfindungsrate sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für BPA zu bestimmen. Die Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus drei unabhängigen Messungen. Die Wiederfindungsrate betrug im Mittel 105 %. Die Nachweisgrenze lag bei $1,9 \mu\text{g} / \text{L}$ und die Bestimmungsgrenze bei $5,37 \mu\text{g} / \text{L}$.

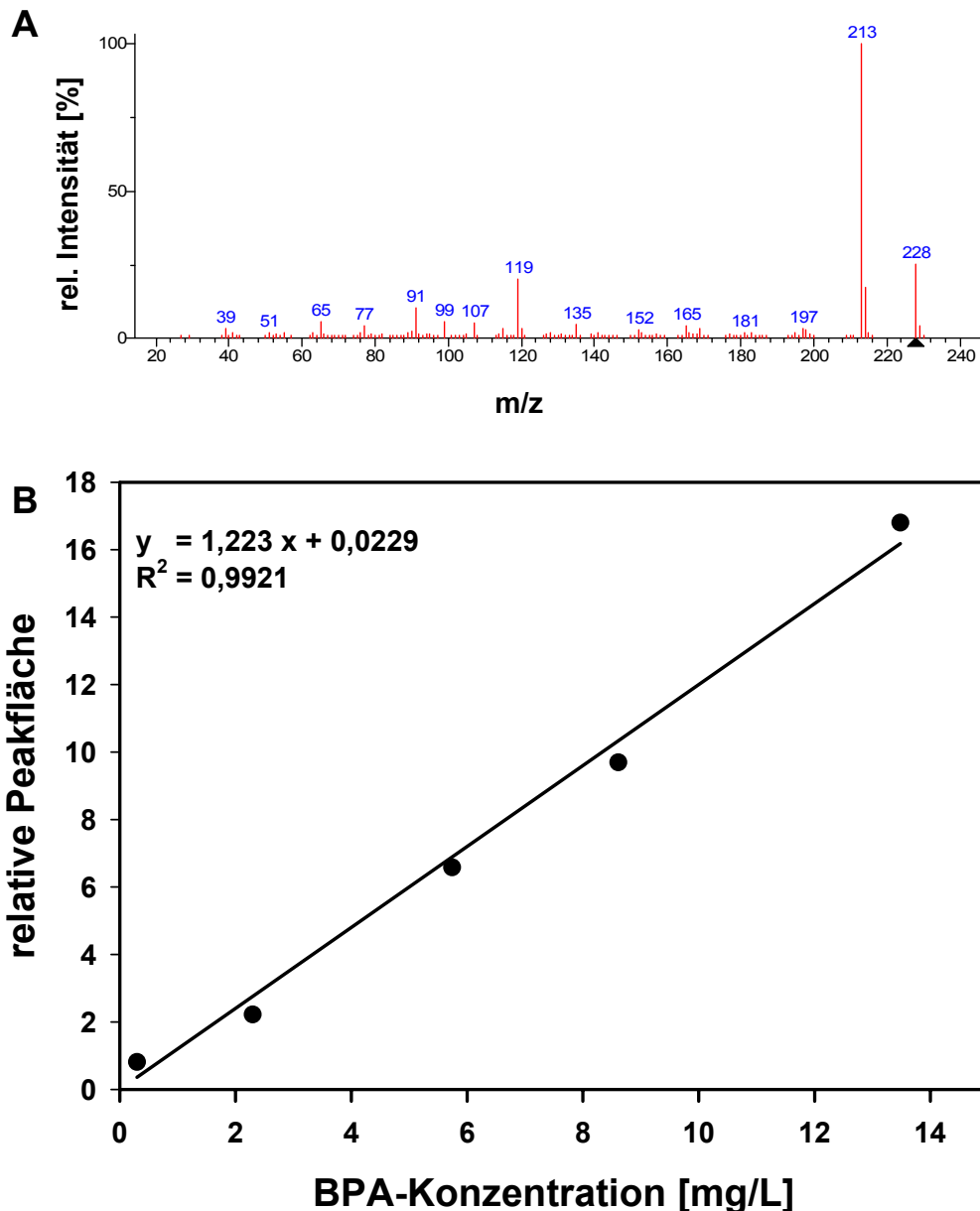


Abb. 3-12: Massenspektrum von Bisphenol A (**A**) und Kalibrierkurve für die BPA-Quantifizierung mittels GC / MS (**B**). Kalibrierungsfunktion und Korrelationskoeffizient (R^2) sind angegeben. Die Angabe der BPA-Konzentration ist als mg / L des Lösungsmittels zu verstehen.

Da die Herstellung von Extrakten aus den Gewässerproben viele Schritte der Probenvorbereitung und Aufarbeitung umfasste (vgl. Kapitel 2.3), wurde die komplette Aufarbeitung auch mit destilliertem Wasser durchgeführt, um eventuell auftretende Hintergrundsignale von den Probensignalen subtrahieren zu können. Dadurch wurde gewährleistet, dass in den Gewässerextrakten keine methodischen Artefakte gemessen wurden.

BPA wurde im Flussverlauf in Proben aller Entnahmestellen gefunden. **Abbildung 3-13** zeigt die um den Anreicherungsfaktor 1000 bereinigte BPA-Konzentrationen in der Alb bzw. in den Kläranlagenausläufen. Dabei fällt auf, dass BPA bereits in erheblichen Mengen (2,5 ng / L) in der Nähe der Alb-Quelle (Alb 0) auftrat. Diese Konzentration stieg auf mehr als 4 ng / L bis zur nächsten Probennahmestelle (Alb 1) an. Im Kläranlagenauslaufwasser der Kläranlage Neurod (Alb 2) wurde keine relevante Erhöhung der BPA-Menge festgestellt und auch bei Alb 3 und Alb 4 blieb der Wert in etwa konstant. Eine starke Erhöhung um das 4-fache erlangte der Messwert im Auslaufwasser der Kläranlage Neureut (16,2 ng / L). Im Fluss selbst nahm der Wert nach dem Klärwasser-Einleitkanal wieder ab (Alb 6), allerdings blieb er fast doppelt so hoch (7,3 ng / L) wie vor der Kläranlage (Alb 4). Eine statistische Auswertung dieser Messergebnisse konnte nicht erfolgen, da es sich um Einzelbestimmungen eines bestimmten Probennahmezeitraumes (Juli 2001) handelte.

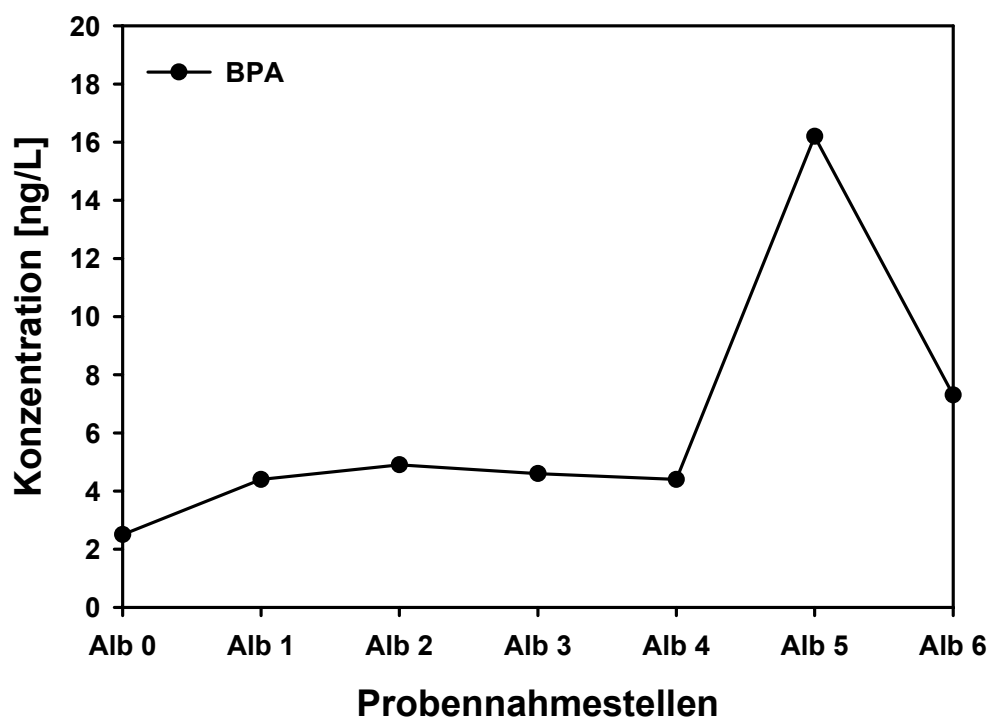


Abb. 3-13: BPA-Nachweis und -Quantifizierung im Flussverlauf der Alb. Die einzelnen Probennahmestellen sind in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Die Werte stammen aus einer Einzelbestimmung eines Probennahmezeitraumes (Juli 2001). Die Linie stellt den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar.

3.2 ENDOKRIN WIRKSAME SUBSTANZEN IN GEWÄSSERPROBEN

3.2.1 Rezeptorbindungsstudien mit Gewässerextrakten

Der Nachweis der Bindung von Wasserinhaltsstoffen an den Östrogen- oder Androgenrezeptor liefert einen Hinweis darauf, ob ED im Albwasser vorhanden sind, die den natürlichen Liganden vom Rezeptor verdrängen können. Dazu wurden die Fraktionen der 1000-fach konzentrierten Gewässerextrakte der Probenahme vom Juli 2001 (vgl. Kapitel 2.3.4) in Rezeptorbindungsstudien getestet. Die Bestimmung des Bindungspotenzials erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten. Die Rezeptoren wurden aus Lebern von männlichen adulten *Xenopus laevis* gewonnen.

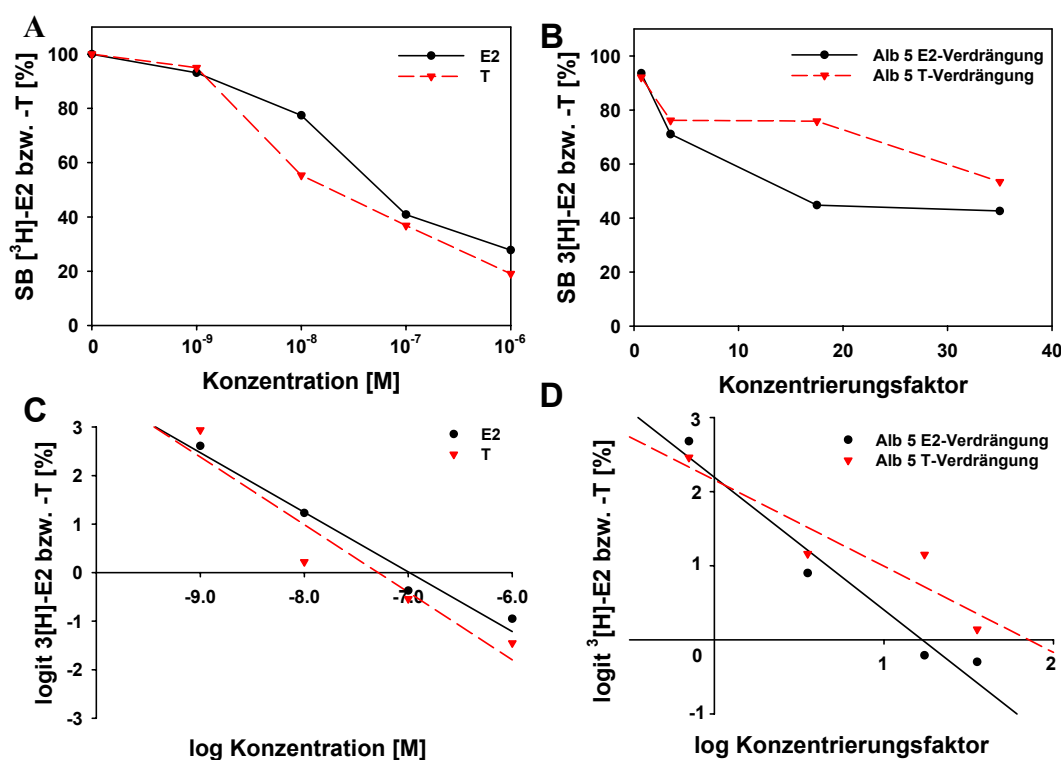


Abb. 3-14: Beispielkurven der kompetitiven Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{-E2}$ bzw. $[^3\text{H}]\text{-T}$ vom ER durch E2 bzw. T (A) sowie Verdrängungskurven eines Alb-Extraktes (B, Mittelwerte, $n = 2$). Die entsprechenden Geraden nach logit / log -Umformung zeigen die Teilabbildungen C und D. Durch diese Umformung lässt sich das Bindungspotenzial der Alb- und Kläranlagen- auslaufextrakte in E2- bzw. T-Äquivalenten berechnen.

Beispielhaft soll anhand von **Abbildung 3-14** erläutert werden, wie die Verdrängungskurven und die anschließende mathematische Transformation zu Werten für das Verdrängungspotenzial von Gewässerinhaltsstoffen aus den Extrakten führt.

Die in den Rezeptorbindungsstudien erhaltenen Kompetitionskurven wurden durch logit / log – Transformation linearisiert. Die Geradengleichung ($y = ax + b$) der Regressionsgeraden ergab den Wert für logit = 0. Mit diesem Wert konnte durch Invertierung des Logarithmus der IC_{50} -Wert (Inhibiting Concentration 50 %) der natürlichen Liganden und der Probenextrakte berechnet werden. Bei jedem neuen Versuchsansatz wurde eine Verdrängungskurve des entsprechenden natürlichen Liganden erstellt und der IC_{50} -Wert bestimmt, um die entsprechenden getesteten Proben mit diesem Wert korrelieren zu können. Aus diesem Grund wird die Berechnung an dieser Stelle beispielhaft für die in **Abbildung 3-14** aufgeführten Verdrängungskurven der natürlichen Liganden E2 und T aufgeführt: Die Geradengleichungen lauten $y = -1,228 x - 8,580$ (E2) und $y = -1,393 x - 10,155$ (T). Daraus ergeben sich nach Invertierung des Logarithmus die IC_{50} -Werte $1,03 \cdot 10^{-7}$ M (E2) und $5,1 \cdot 10^{-8}$ M (T).

Die Verdrängungsdaten der Gewässerextrakte wurden über Konzentrierungsstufen ermittelt, da absolute Konzentrationsangaben zu Inhaltsstoffen in komplexen Gemischen nicht möglich sind. Folglich musste die Verdrängungskapazität der Albproben durch die Berechnung von E2- bzw. T-Äquivalenten angegeben werden. Bei der Berechnung wurde berücksichtigt, dass die Gewässerextrakte in konzentrierter Form vorlagen. Die entsprechenden Werte, die für die einzelnen Probennahmestellen in **Tabelle 3-1** aufgelistet sind, beinhalten demnach nicht mehr den Anreicherungsfaktor der Extrakte.

Tab. 3-1: E2- und T-Äquivalente [nM] der Gewässerextrakte im Flussverlauf der Alb. F: Fraktion; n.d.: nicht detektierbar.

Alb	F1-E2	F2-E2	F3-E2	F1-T	F2-T	F3-T
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	7,72	0,87	2,72	n.d.
2	0,35	24,64	10,19	8,29	10,82	6,69
3	9,84	13,98	3,54	1,57	1,62	2,70
4	7,40	6,33	6,11	9,31	1,57	n.d.
5	9,90	26,36	10,51	26,81	42,01	7,31
6	1,43	19,99	23,18	2,69	31,71	3,33

Es fällt auf, dass die fraktionierten Extrakte von Alb 0 in den Bindungsstudien weder E2 noch T vom Rezeptor verdrängen konnten und folglich keine Berechnung von E2- bzw. T-Äquivalenten möglich war. Im weiteren Flussverlauf ließen sich einige Regelmäßigkeiten bezüglich des Bindungspotenzials von Extraktinhaltsstoffen an den ER oder AR feststellen. Prinzipiell waren die höchsten Konzentrationen an Hormonäquivalenten in den Extrakten des Kläranlagenauslaufwassers zu finden (Alb 2, Alb 5). Mit den einzelnen Extraktfraktionen wurden uneinheitliche Ergebnisse im Hinblick auf die Hormonäquivalentkonzentration aus Proben vor und nach den Kläranlagenausläufen (Alb 1, 3, 4, 6) erzielt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde deshalb die Summe der Äquivalentkonzentrationen gebildet und in **Abbildung 3-15** dargestellt.

Beide Verlaufskurven zeigen, dass die Konzentrationen an rezeptorbindenden Stoffen vor dem Kläranlagenauslauf immer geringer als nach dem Zufluss des Auslaufwassers waren, was auf den Verdünnungseffekt des Flusswassers zurückzuführen ist. Es ist weiterhin zu sehen, dass sich die Konzentration der Hormonäquivalente im Flussverlauf erhöht. Dies wiederum deutet auf eine Anreicherung der in Frage kommenden Substanzen im Flussverlauf hin, die den Verdünnungseffekt überlagert.

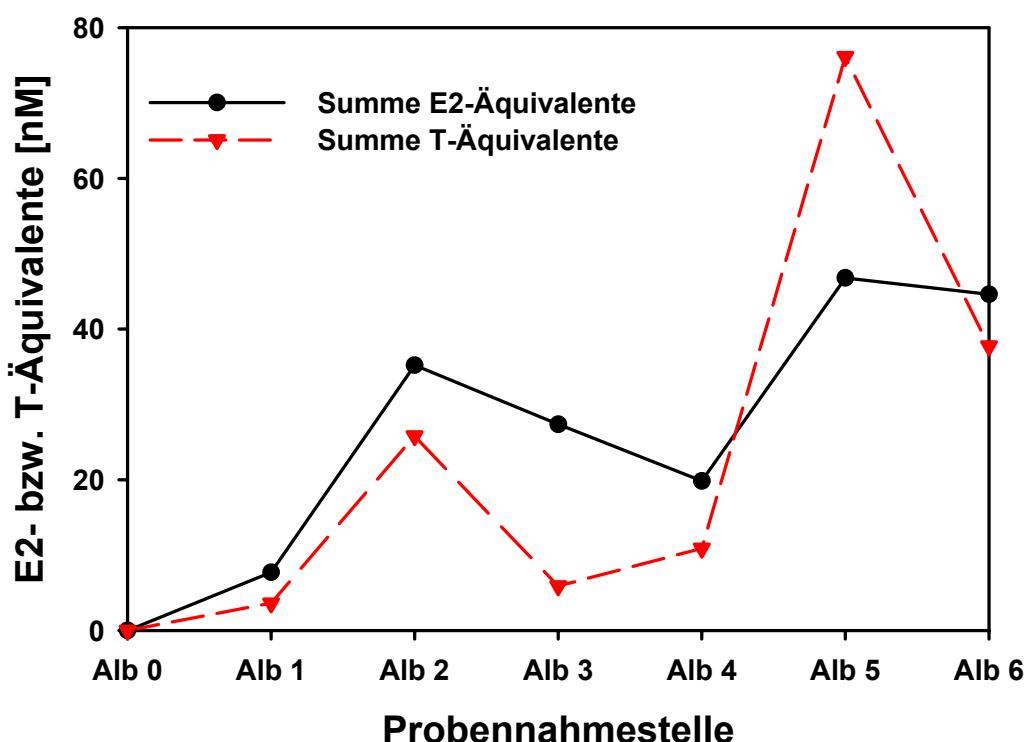


Abb. 3-15: Summenkurven der E2- bzw. T-Äquivalente im Albverlauf (als gleitender Durchschnitt). Die Werte setzen sich aus den Einzelwerten der drei Fraktionen jeder Probennahmestelle zusammen.

3.2.2 Behandlung von Leberzellkulturen mit Gewässerextrakten

Die Kultivierung von Leberzellen aus *Xenopus laevis* und die Behandlung der Zellen mit den Gewässerextrakten diente der Feststellung, inwieweit die Inhaltsstoffe der Extrakte zur Induktion bzw. Repression bestimmter hormonregulierter Biomarkergene beitragen können. Eine Reihe von Vorversuchen ergab ein modifiziertes Durchführungsprotokoll zur Erstellung von Primärkulturen, die in 24-Well-Platten kultiviert werden konnten. Dies ermöglichte einen relativ hohen Probenumsatz pro präpariertem Tier. Es zeigte sich, dass Intervalle von 12 Stunden zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mediumwechseln und Substanzzugaben für eine Gesamtdauer von 36 Stunden die sensitivste Behandlungsmethode darstellte.

Die Vitalität der kultivierten Leberzellen wurde durch die Behandlung mit den Testsubstanzen nicht beeinträchtigt, was mit Hilfe einer Trypanblaufärbung der Zellmembranen festgestellt wurde. Durchschnittlich waren 10 % der Zellen in den Kulturschalen tot, es konnte jedoch kein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen Sterberate der Zellen und Behandlung mit den Chemikalien ermittelt werden. Des Weiteren gingen ungefähr weitere 10 % der Zellen während des Behandlungsprozesses verloren, da eine geringe mechanische Belastung beim Mediumwechsel und bei der Substanzzugabe nicht zu vermeiden war. Jede Präparation einer *X. laevis* Leber ergab 20 – 40 Millionen Zellen, so dass mindestens 40 Kavitäten der Kulturschalen mit Zellen beschickt werden konnten.

3.2.3 Das Retinol-binding Protein als Biomarker

Neben den östrogenartigen Substanzen befinden sich in Umweltproben auch Stoffe, die andere Wirkmechanismen aufweisen (antiöstrogen, (anti)androgen). Um diese Wirkmechanismen mit einem Summenparameter abschätzen zu können, wurde das RBP als neuer Biomarker etabliert, da er von Androgenen und Östrogenen antagonistisch reguliert wird (McKEARIN ET AL. 1987).

Die Expression der RBP-mRNA wurde nach Behandlung der Zellen mit E2 und EE (10^{-9} bis 10^{-6} M) gemessen. Steigende Konzentrationen beider Substanzen erhöhten proportional die RBP-mRNA-Expression. Im Gegensatz zu den EE-behandelten Zellen konnte in Zellen, die mit E2 behandelt wurden, nur eine geringere, nicht-signifikante Erhöhung der RBP-mRNA-

Transkription gezeigt werden. EE-behandelte Zellen wiesen bei drei Konzentrationen (10^{-8} bis 10^{-6} M) eine signifikante Induktion der Transkription auf, die bei 10^{-6} M ungefähr 2,5-fach über dem Kontrollniveau lag. (**Abb. 3-16**). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in den folgenden Experimenten 10^{-6} M EE als östrogene Positivkontrolle verwendet.

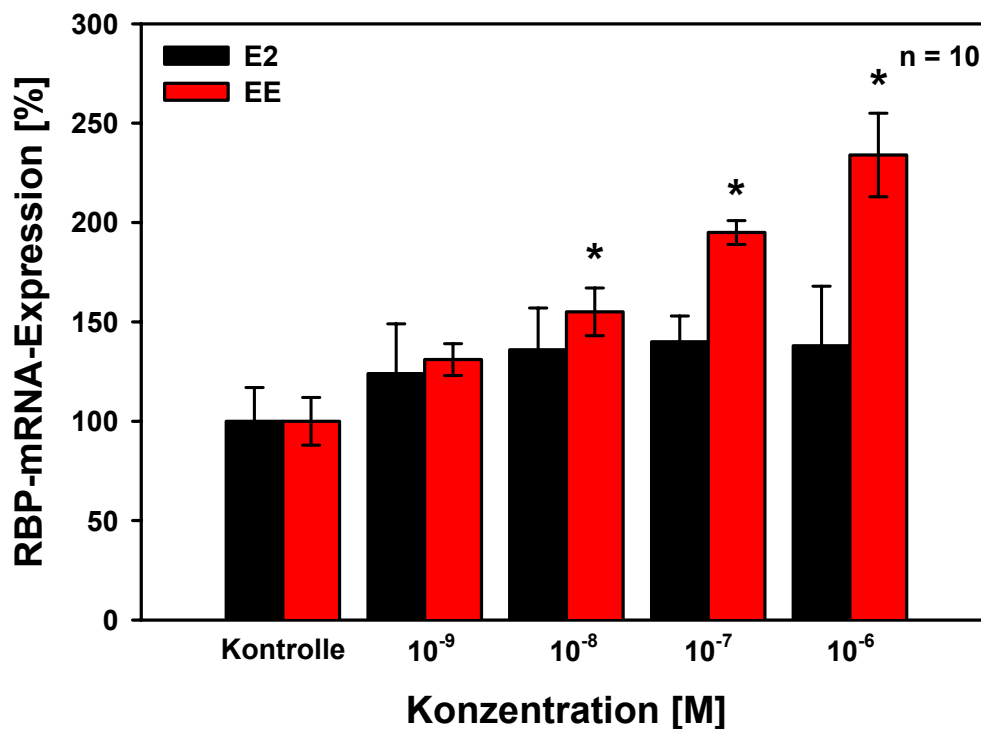


Abb. 3-16: RBP-mRNA-Expression in Leberzellen, die jeweils mit 4 Konzentrationen der Östrogene E2 und EE behandelt wurden (10^{-9} bis 10^{-6} M). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Relation zu den mittleren Lösungsmittelkontrollwerten (100 %) dargestellt. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle hin ($p < 0,05$).

Das RBP-mRNA-Expressionsmuster nach Zugabe von Androgenen (T, DHT, MT) zu den Zellen ergab eine erkennbare Tendenz zur reduzierten Synthese von RBP-mRNA vor allem durch T und DHT. Eine signifikante Reduktion des RBP-mRNA-Gehalts war durch beide Androgene nicht nachweisbar. MT zeigte keine Wirkung auf die RBP-mRNA-Transkription, da die RBP-mRNA-Messwerte aus den mit MT behandelten Zellen den Kontrollwerten aus unbehandelten Zellen ähnelten (**Abb. 3-17**). Diese Ergebnisse führten zur Verwendung von DHT 10^{-6} M als androgene Positivkontrolle.

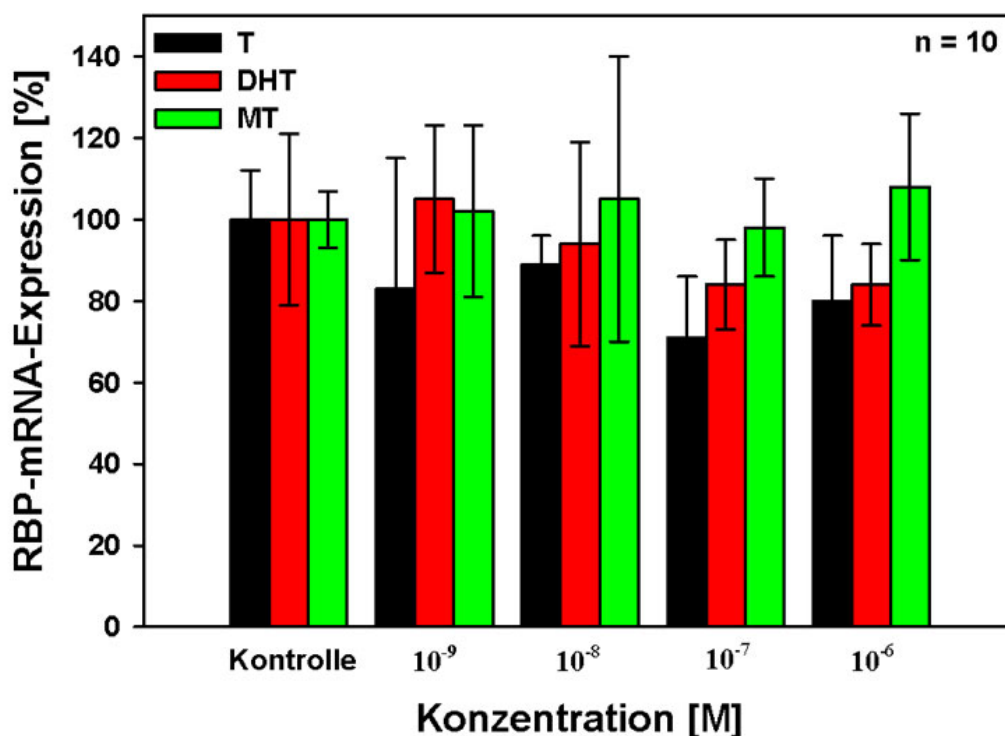


Abb. 3-17: RBP-mRNA-Expression in Leberzellen, die mit jeweils 4 Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} M) dreier verschiedener Androgene (T, DHT, MT) behandelt wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Relation zu den mittleren Lösungsmittelkontrollwerten (100 %) dargestellt. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben.

In einem weiteren Experiment wurden die Wirkungen des Antiöstrogens TAM und des Antiandrogens VC auf die RBP-mRNA-Expression in den Leberzellen von *X. leavis* untersucht. Beide Chemikalien zeigten in keiner der zugesetzten Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} M) eine signifikante Veränderung der Transkription der RBP-mRNA im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (**Abb. 3-18**).

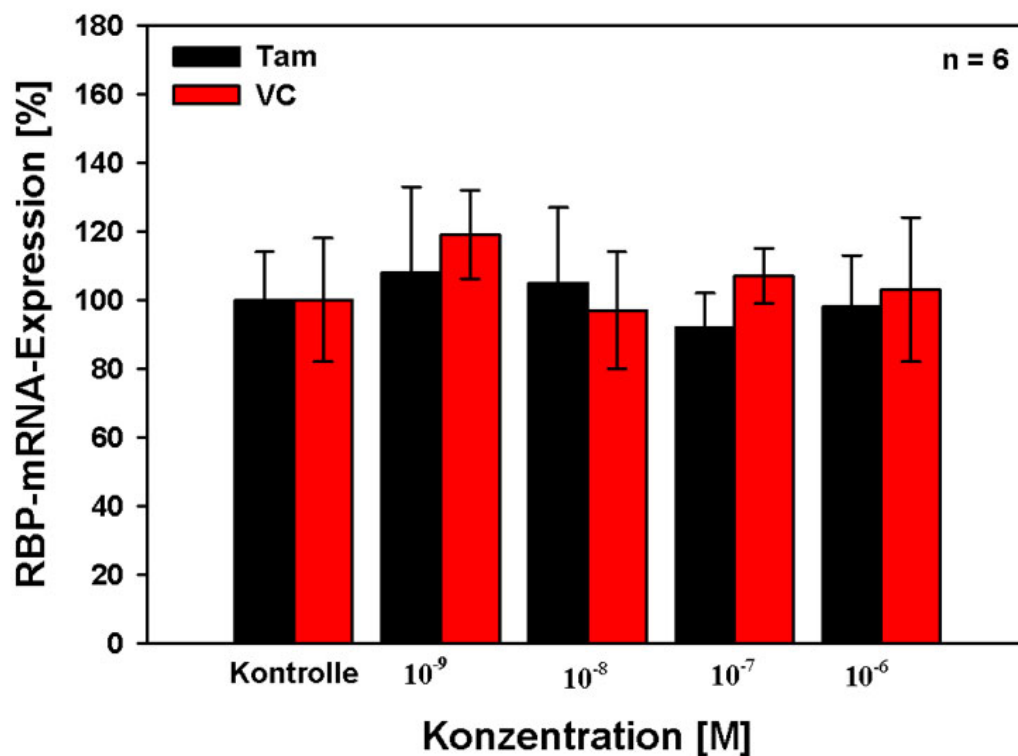


Abb. 3-18: RBP-mRNA-Expression in Leberzellen, die mit jeweils 4 Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} M) des Antiöstrogens TAM und des Antiandrogens VC behandelt wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Relation zu den mittleren Lösungsmittelkontrollwerten (100 %) dargestellt. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben.

Die **Abbildungen 3-16 bis 3-18** stellen die Effekte von einzelnen (anti)östrogenen und (anti)androgenen Substanzen auf die RBP-mRNA-Transkription dar. Weiterführende Experimente sollten zeigen, welche Wirkungen auf die RBP-mRNA-Synthese durch kombinierte Zugabe von Chemikalien mit entgegengesetzten Wirkmechanismen in den Zellen erzielt werden konnten. Zuerst wurden T, DHT und MT in einer Konzentrationsreihe (10^{-9} bis 10^{-6} M) mit EE 10^{-6} M kombiniert. Dabei diente die erhöhte Expression der RBP-mRNA durch EE 10^{-6} M als Positivkontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl alle Konzentrationen von T als auch von DHT den RBP-mRNA-Gehalt im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant senken konnten. Die höchste Konzentration der beiden Androgene (10^{-6} M) bewirkte ein Absinken der RBP-mRNA-Expression unter das Kontrollniveau. MT wies wiederum deutlich geringere Effekte auf: Es konnte allerdings ebenfalls die EE-stimulierte Erhöhung der Transkription signifikant hemmen (außer bei

10^{-8} M), zeigte aber insgesamt eine geringere Reduktion der RBP-mRNA-Synthese als T und DHT (**Abb. 3-19**).

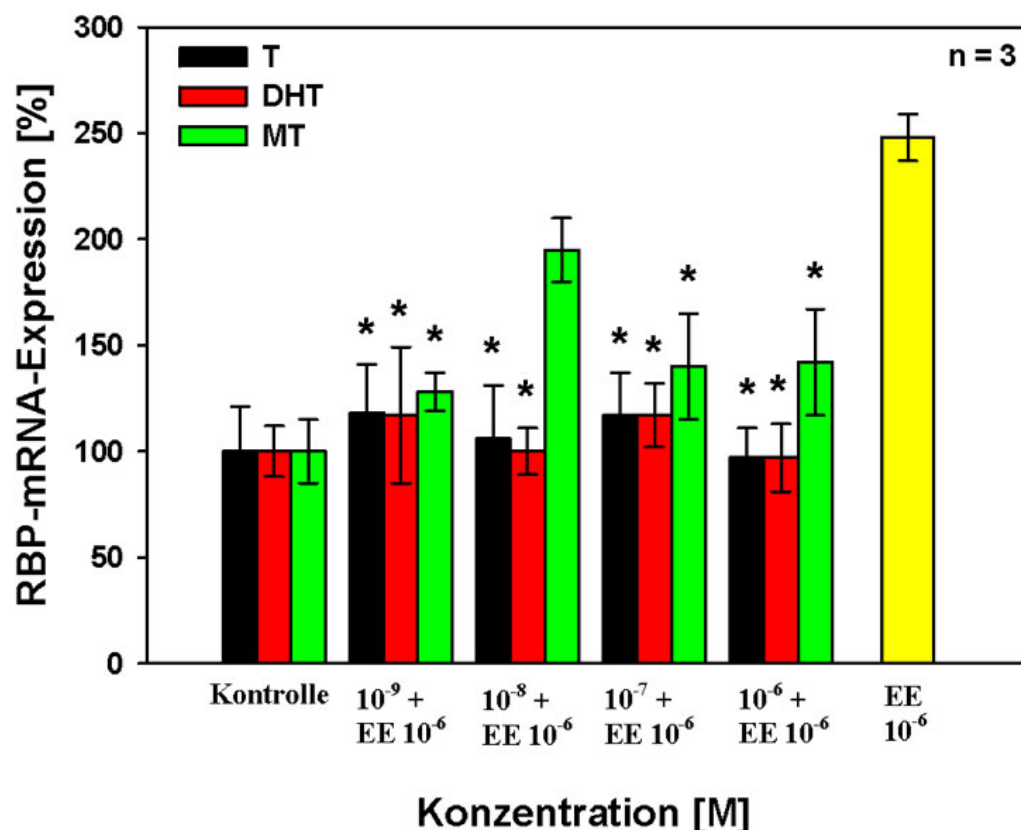


Abb. 3-19: Relative RBP-mRNA-Expression in Leberzellen, die mit 4 Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} M) T, DHT und MT in Kombination mit einer wirksamen Konzentration EE (10^{-6} M) behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Relation zu den Lösungsmittelkontrollwerten dargestellt. EE 10^{-6} M dient als Positivkontrolle. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Positivkontrolle ($p < 0,05$).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen mit TAM in einer Konzentrationsreihe von 10^{-9} bis 10^{-6} M zusammen mit EE 10^{-6} M behandelt, um die stimulierenden Effekte von EE auf die RBP-mRNA-Expression mit einem Antiöstrogen zu beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, dass TAM die durch EE hervorgerufene Induktion der RBP-mRNA-Transkription bei jeder Konzentration signifikant unterbinden konnte. Die EE-bedingte Induktion der Transkription wurde komplett gehemmt, wenn die zugegebenen EE- und TAM-Konzentrationen gleich groß waren (**Abb. 3-20**).

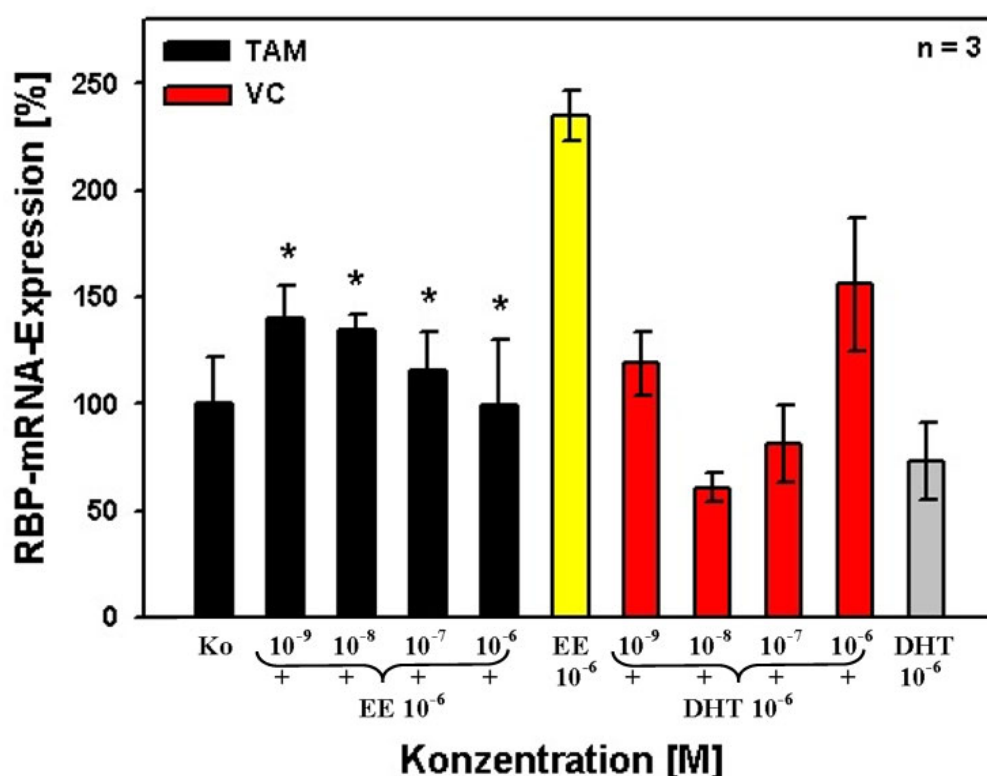


Abb. 3-20: Relative RBP-mRNA-Expression in Leberzellen, die mit 4 Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} M) TAM und VC in Kombination mit einer wirksamen Konzentration EE bzw. DHT (10^{-6} M) behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Relation zu den Lösungsmittelkontrollwerten (Ko) dargestellt. EE bzw. DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur entsprechenden Positivkontrolle ($p < 0,05$).

Schließlich wurde das Antiandrogen VC in vier Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} M) mit dem Androgen DHT (10^{-6} M) kombiniert den Zellen zugegeben. VC erniedrigte die transkriptionshemmende Wirkung von DHT in einer konzentrationsabhängigen Weise. Eine statistische Analyse ergab allerdings keinen signifikanten Effekt. Die RBP-mRNA-Expression übertraf das Kontrollniveau, wenn beide Substanzen in gleicher Konzentration eingesetzt wurden (10^{-6} M). DHT (10^{-6} M) wurde als Positivkontrolle verwendet (**Abb. 3-20**).

In **Abbildung 3-21** werden Ausschnitte aus einem typischen Agarosegel gezeigt, das die amplifizierten PCR-Produkte des RBP und des korrespondierenden internen Standardgens EF darstellt. Die densitometrischen Auswertungen der Gele ergaben keine signifikanten Expressionsunter-

schiede der EF-mRNA in den einzelnen Behandlungsgruppen. Damit konnte die Anwendbarkeit des EF als internes Standardgen für die semiquantitative RT-PCR erneut gezeigt werden. Zusätzlich sind in **Abbildung 3-21** PCR-Produkte abgebildet, welche die RBP-mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen mit Gewässerextrakten zeigen. Im folgenden Abschnitt wird auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen näher eingegangen.

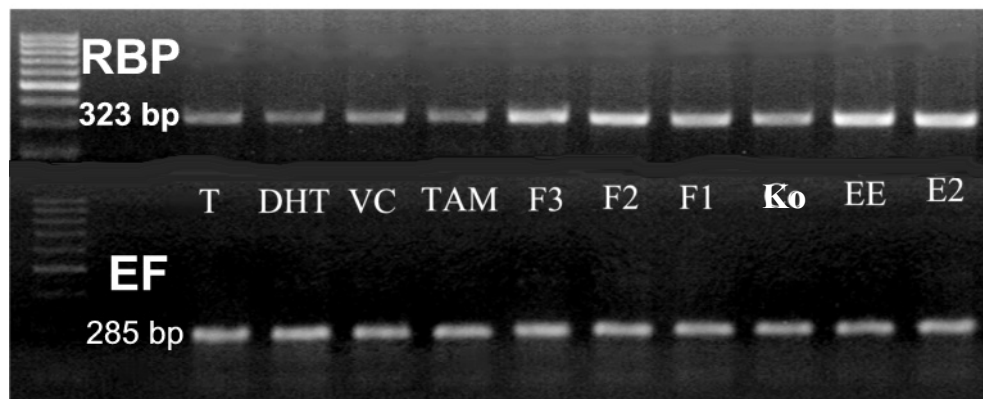


Abb. 3-21: Ein typisches Bild eines Agarosegels, das die RT-PCR-Produkte des RBP (323 bp) und des EF (285 bp) wiedergibt. T: Testosteron, DHT: Dihydrotestosteron, VC: Vinclozolin, TAM: Tamoxifen, F1 – F3: Fraktion 1 – 3 der Gewässerextrakte, Ko: Kontrolle, EE: Ethinylöstradiol, E2: 17 β -Östradiol.

3.2.4 Biomarkerexpression in Leberzellkulturen nach Behandlung mit Gewässerproben

Die Behandlung von Zellkulturen mit Extraktfraktionen aus den Gewässerproben der Alb sollte zeigen, wie ein komplexes Stoffgemisch in einer Umweltprobe auf die Expression bestimmter Biomarkergene wirkt. Als östrogen Biomarker diene der Nachweis von ER-mRNA und als Summenparameter für (anti)östrogene und (anti)androgene Substanzen der Nachweis von RBP-mRNA. Die Zellen wurden jeweils mit den drei Fraktionen behandelt, die aus den Gesamtextrakten der Albproben gewonnen wurden. Da die 1000-fach aufkonzentrierten Fraktionen verwendet wurden, erfolgten auch in diesem Versuchsansatz regelmäßige Vitalitätstests der Zellen, die durchweg zeigten, dass die Extraktfraktionen die Vitalität der Zellen nicht beeinflussten.

Die **Abbildungen 3-22 bis 3-28** zeigen die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten, in denen die Extraktfraktionen der entsprechenden Probennahmestellen der Alb getestet wurden. Im Folgenden soll das Ergebnis für jede Stelle kurz zusammengefasst werden, wobei Alb 5 einer ausführlicheren Ergebnisbetrachtung unterzogen wird.

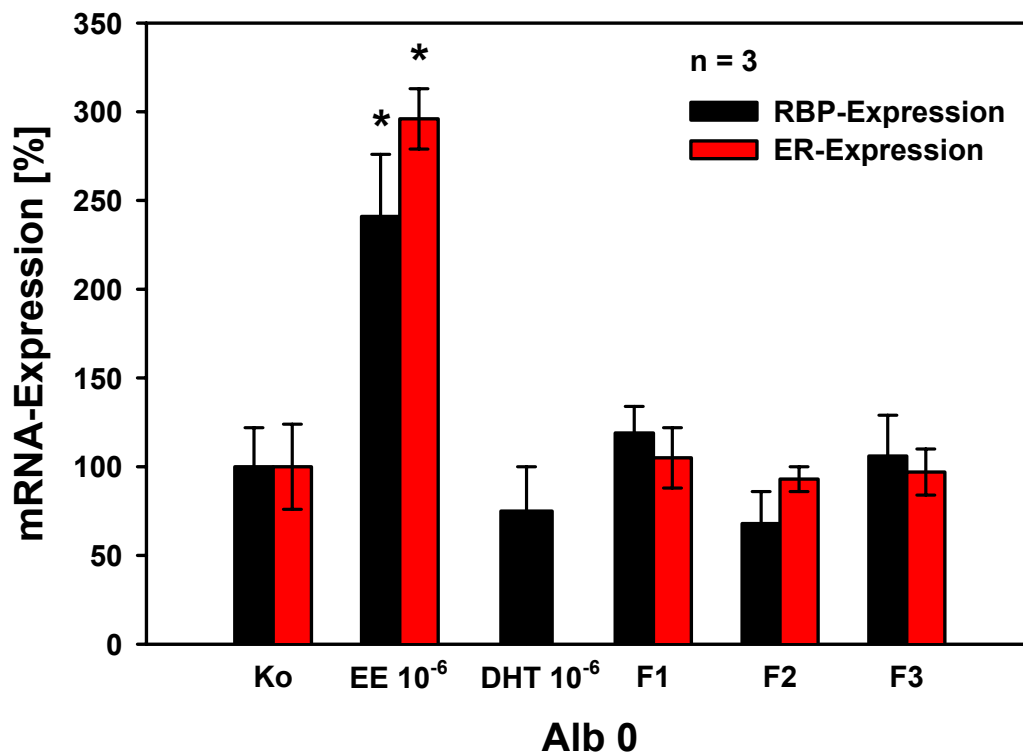


Abb. 3-22: Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1 – F3) der Probennahmestelle Alb 0. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$). EE und DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Eine ER-Expression konnte bei DHT-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Fraktion 1 und Fraktion 3 der Probennahmestelle Alb 0 zeigten eine leicht erhöhte RBP-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Fraktion 2 erniedrigte die RBP-mRNA-Synthese auf das Niveau der androgenen Positivkontrolle (DHT 10^{-6} M). Die Expression der ER-mRNA wurde nicht beeinflusst (**Abb. 3-22**).

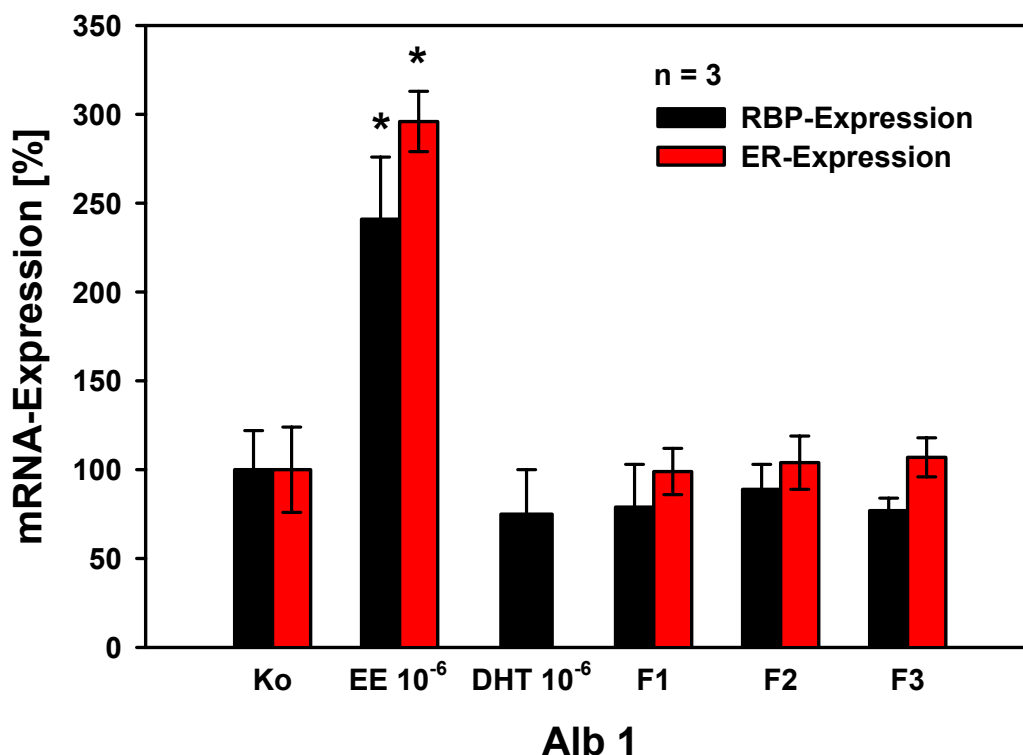


Abb. 3-23: Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1 – F3) der Probennahmestelle Alb 1. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$). EE und DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Eine ER-Expression konnte bei DHT-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Alle drei Extraktfraktionen der Probennahmestelle Alb 1 erniedrigten die RBP-mRNA-Transkription im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die ER-mRNA-Synthese erreichte ungefähr das Niveau der Lösungsmittelkontrolle (**Abb. 3-23**).

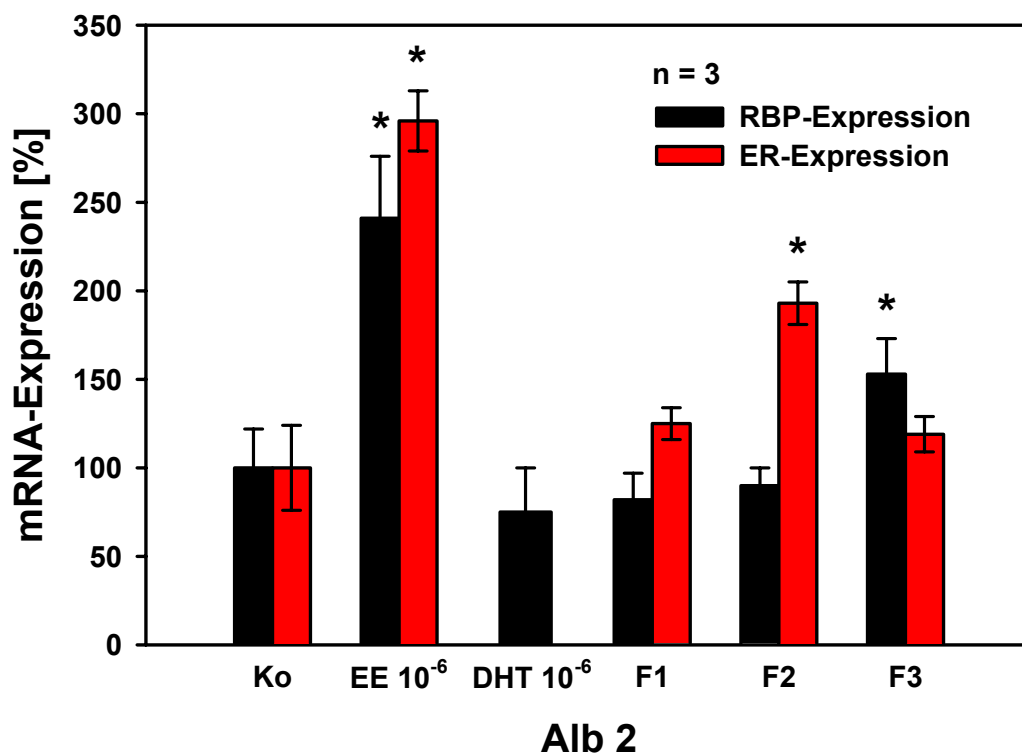


Abb. 3-24: Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1 – F3) der Probennahmestelle Alb 2. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$). EE und DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Eine ER-Expression konnte bei DHT-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Die Probennahmestelle Alb 2 repräsentiert Extrakte aus einem Kläranlagenauslauf. Die RBP-mRNA-Expression wurde von allen drei Fraktionen erhöht, wobei Fraktion 3 eine signifikante Erhöhung (1,5-fach) der Expression bewirkte. Eine signifikante Erhöhung der ER-mRNA-Transkription ergab sich für die Fraktion 2 (1,9-fach). Auch die anderen Fraktionen (F1 und F3) induzierten die ER-mRNA-Synthese (**Abb. 3-24**).

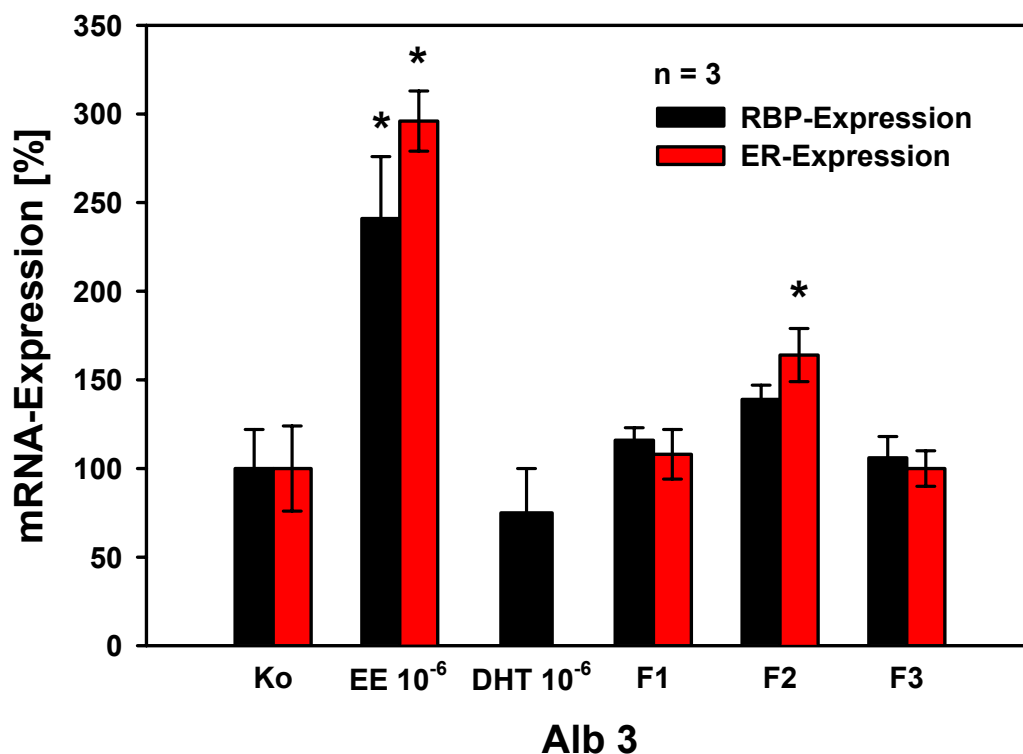


Abb. 3-25: Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1 – F3) der Probennahmestelle Alb 3. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$). EE und DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Eine ER-Expression konnte bei DHT-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Die Fraktionen der Probennahmestelle Alb 3 induzierten ebenfalls eine leichte Erhöhung der RBP-mRNA-Synthese, wobei Fraktion 2 eine ungefähr 1,4-fache Erhöhung bewirkte. Eine signifikante Erhöhung der ER-mRNA-Expression wurde mit Fraktion 2 erzielt (1,6-fach). Die anderen beiden Fraktionen (F1 und F3) ergaben keine Induktion der ER-mRNA-Synthese (Abb. 3-25).

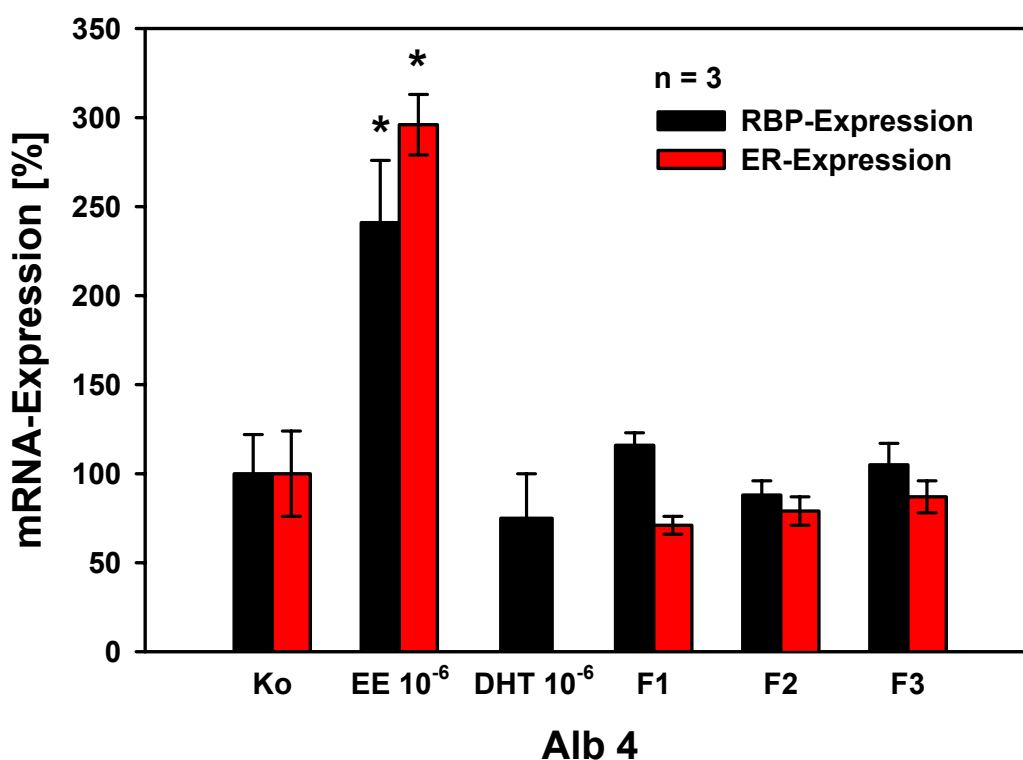


Abb. 3-26: Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1 – F3) der Probennahmestelle Alb 4. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$). EE und DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Eine ER-Expression konnte bei DHT-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Mit Fraktionen der Probennahmestelle Alb 4 konnte keine eindeutige Tendenz der Beeinflussung der RBP-mRNA-Transkription festgestellt werden, die Werte befinden sich im Bereich des Kontrollniveaus. Die Expression des östrogenen Biomarkers ER-mRNA wurde unter das Kontrollniveau reguliert, wobei Fraktion 1 eine ungefähr 30 %ige Reduktion bewirkte (**Abb. 3-26**).

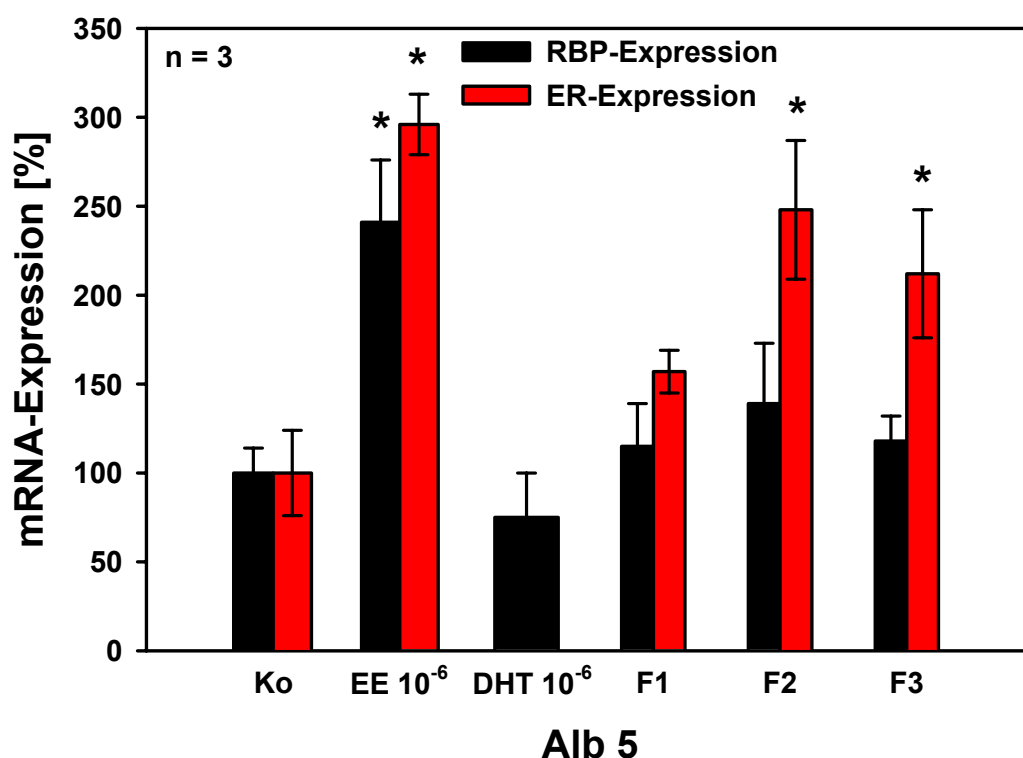


Abb. 3-27: Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1 – F3) der Probenahme Stelle Alb 5. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$). EE und DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Eine ER-Expression konnte bei DHT-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten, wie bereits in den Rezeptorbindungsstudien, die Fraktionen der Stelle Alb 5 (Kläranlagenauslaufwasser). Alle Fraktionen bewirkten eine 1,5- bis 2,5-fache Induktion der ER-mRNA-Transkription. Die statistische Analyse ergab eine signifikante Erhöhung für die Fraktionen 2 und 3. Der RBP-mRNA-Gehalt stieg nicht signifikant um das 1,3- bis 1,5-fache an. Beide Biomarker gaben Hinweise darauf, dass östrogene ED im gereinigten Abwasser vorkommen. Die Unterschiede in der Höhe der Induktion zwischen einem rein östrogenen Biomarker (ER) und einem summarischen (anti)östrogenen und (anti)androgenen Biomarker (RBP) zeigten, dass neben Substanzen mit östrogenen Effekten auch Substanzen mit antiöstrogenen bzw. mit androgenen Wirkungen in den fraktionierten Extrakten vorhanden sein müssen (**Abb. 3-27**).

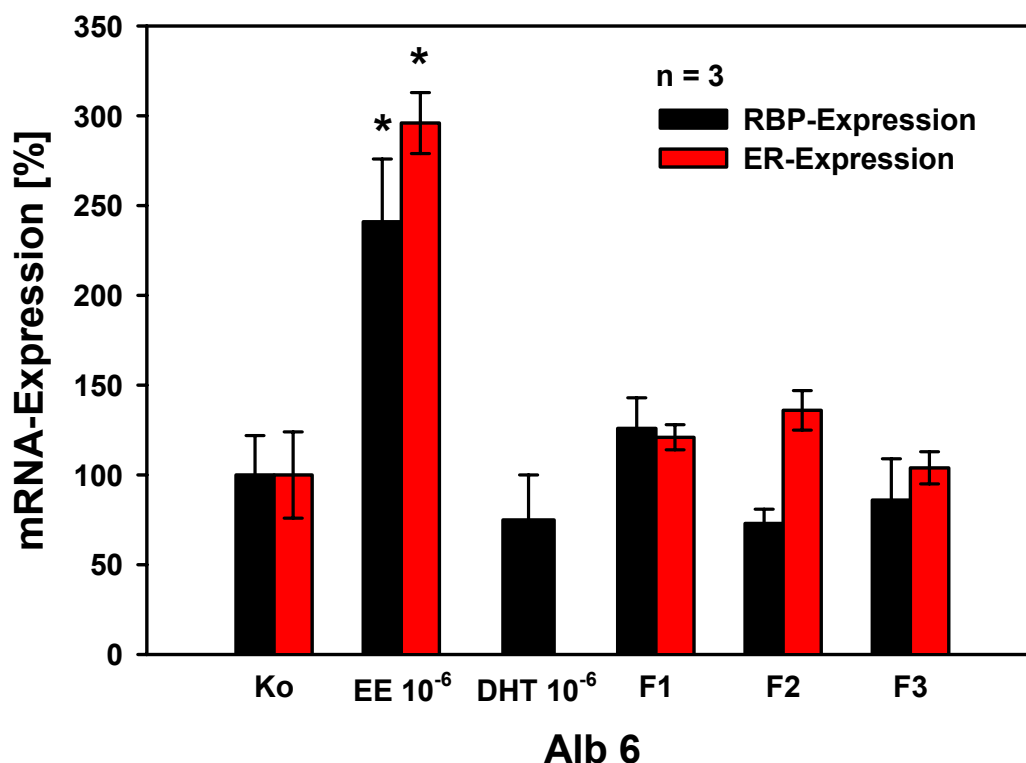


Abb. 3-28: Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1 – F3) der Probennahmestelle Alb 6. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,05$). EE und DHT 10^{-6} M dienen als Positivkontrollen. Eine ER-Expression konnte bei DHT-Behandlung nicht nachgewiesen werden.

Die Fraktionen aus Proben der Stelle Alb 6 verursachten durchweg eine nicht signifikante Induktion der ER-mRNA-Expression (ungefähr 1,2- bis 1,4-fach). RBP zeigte ein uneinheitliches Ergebnis, da Fraktion 1 die RBP-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöhte, die Fraktionen 2 und 3 erniedrigten die RBP-Synthese, Fraktion 2 sogar um etwa 30 % auf das Niveau der androgenen Positivkontrolle (**Abb. 3-28**).

3.3 NACHWEIS AUSGEWÄHLTER ENDOKRIN WIRKSAMER STOFFE IN DER ALB

Die Ergebnisse aus den Gewässeruntersuchungen wiesen darauf hin, dass neben BPA weitere ED in der Alb vorhanden sein müssen. Deswegen wurde nach bestimmten bekannten ED in den Gesamtextrakten mittels GC / MS-Analyse gesucht, analog der in Kapitel 2.3.5 beschriebenen Methode. Die Auswahl der Substanzen ist zum einen in den zum Analysezeitpunkt möglichen Nachweismethoden begründet, zum anderen in der gewonnen Erkenntnis (s. Kapitel 3.2), dass überwiegend östrogenartige Substanzen im Fluss auftreten. Eine systematische Untersuchung der Alb bzw. der Albextraktfraktionen hinsichtlich der Identifikation unbekannter ED konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Die analysierten Substanzen der Wahl waren das synthetische Östrogen EE, die Phytoöstrogene Campesterol und β -Sitosterol sowie das schwache Antiandrogen o,p'-DDE (Dichlordiphenyldichlorethylen).

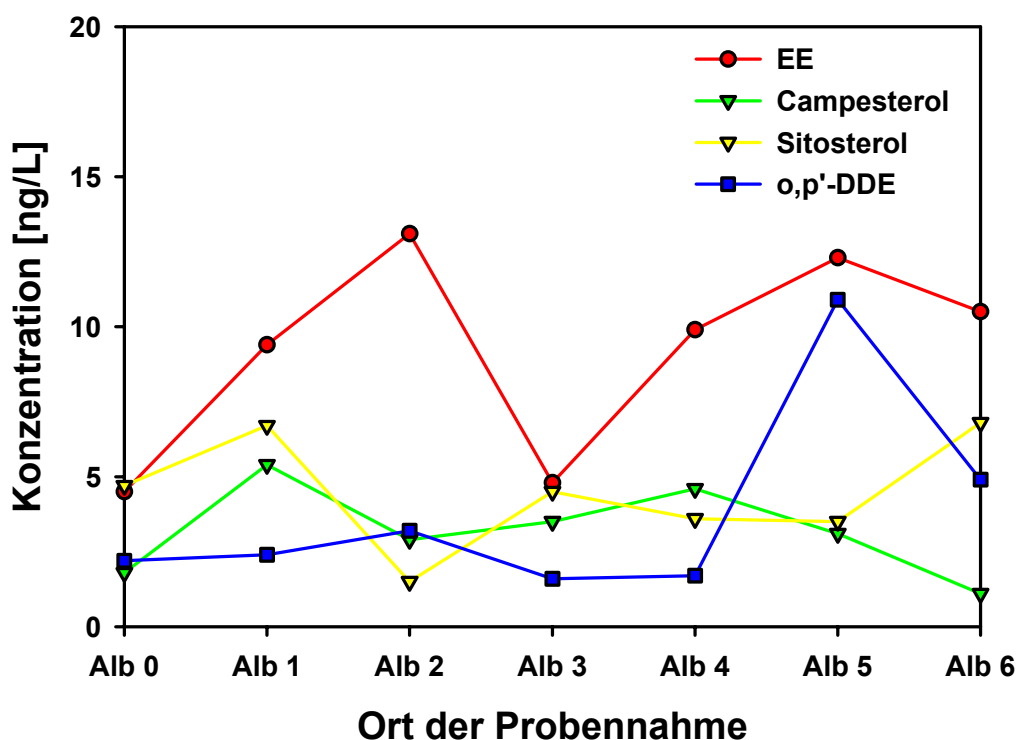


Abb. 3-29: Nachweis und Quantifizierung von EE, Campesterol, β -Sitosterol und o,p'-DDE im Flussverlauf der Alb (Linien = gleitender Durchschnitt). Die einzelnen Probennahmestellen sind in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Die Werte stammen wie die BPA-Nachweise (**Abb. 3-13**) aus einer Einzelbestimmung eines Probennahmezeitraumes (Juli 2001).

Abbildung 3-29 zeigt, in welchen Konzentrationen die einzelnen Substanzen im Albverlauf nachgewiesen wurden. Die Werte für EE (jeweils 13 ng / L) und o,p'-DDE (10 ng / L) sind am höchsten in den Kläranlagenausläufen (Alb2 und Alb 5) und belegen die ansteigende Belastung während des gesamten Verlaufs der Alb bis hin zur Mündung, wo Werte von 10 ng / L für EE und 5 ng / L für o,p'-DDE gemessen wurden. Die Belastung durch die Phytoöstrogene Campesterol sowie β -Sitosterol liegt relativ gleichmäßig bei Werten zwischen 2 und 6 ng / L im gesamten Flussverlauf, so dass eine punktuelle Einleitung durch Kläranlagenausläufe nicht vorliegt.

4 DISKUSSION

Die Belastung der Umwelt mit endokrin wirksamen Substanzen, welche die Fortpflanzungsbiologie der Lebewesen stören, ist ein aktuelles Problem in der ökotoxikologischen Forschung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei mögliche Ansätze durchgeführt, die mit Hilfe des Modellorganismus *Xenopus laevis* zur Feststellung der Belastung und Gefährdung von aquatischen Lebewesen durch ED beitragen können.

Der erste Ansatz ging von der umfassenden Untersuchung eines Einzelstoffes (BPA) aus, der zum einen hinsichtlich seiner biologischen Aktivität, zum anderen hinsichtlich seiner chemischen Nachweisbarkeit im Labor und in der Umwelt erfasst wurde. Es wurde berücksichtigt, dass Wirkungen von ED auf die Reproduktionsbiologie der Lebewesen in erster Linie sichtbar werden, wenn der Gesamtorganismus diesen Substanzen ausgesetzt wird. Bisher bestand häufig eine Diskrepanz zwischen artifiziellen molekularbiologischen Testverfahren und der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das intakte Lebewesen. Eine umfassende Betrachtung der Effekte bestimmter ED muss von der Wirkung der jeweiligen Substanz auf den Gesamtorganismus ausgehen. Jedoch sind auch Laboruntersuchungen, die diesen Weg verfolgen, immer auf künstliche Testsysteme beschränkt.

Der zweite Ansatz untersuchte Gewässerproben aus einem Modellgewässer, die aus einem komplexen Gemisch von endokrin wirksamen Substanzen bestehen. Dieses Gemisch wurde fraktioniert und die einzelnen Fraktionen wurden biochemischen und molekularbiologischen Testmethoden unterzogen. Dadurch ließ sich die endokrine Wirksamkeit einer Gewässerprobe abschätzen. Dazu war es erforderlich, neben den Bioassays zur Feststellung östrogenen Wirkungen zusätzliche Methoden anzuwenden, die eine Aussage über andere Wirkmechanismen zuließen. Dies wurde im Rahmen der Arbeit durch die Verwendung von Androgenrezeptorbindungsstudien und durch die Einführung des RBP als summarischen Biomarker für sämtliche Wirkmechanismen durchgeführt. Begleitende gewässeranalytische Untersuchungen sollten Hinweise auf die Belastung von Umweltproben mit bestimmten ED liefern.

Die folgende Diskussion soll die erzielten Ergebnisse kritisch beleuchten und abschließend beide Ansätze vergleichend betrachten.

4.1 UMWELTBELASTUNG MIT ED – EINZELSTOFFANSATZ

4.1.1 *In vivo*-Labormethoden zur Untersuchung der Wirkungen von ED

Kontrollierte Laboruntersuchungen mit geeigneten Testorganismen liefern nützliche Hinweise zu Dosis-Wirkungs-Beziehungen und molekularen Wirkmechanismen einzelner Substanzen. Ihre Aussagekraft ist jedoch hinsichtlich einer integrativen biologischen Antwort der Organismen auf eine chronische Exposition mit realen Konzentrationen eines Gemisches von Umweltchemikalien limitiert (Fox 2001). Nur mit *in vivo*-Experimenten lassen sich realistische Expositionsszenarien simulieren. Deshalb sollten unabhängig von den beobachteten *in vitro*-Effekten zwingend *in vivo*-Untersuchungen erfolgen, um zu klären, ob die verdächtigen Substanzen tatsächlich einen Einfluss auf die Reproduktionsbiologie haben. Dabei sollte beachtet werden, dass die zu untersuchenden Substanzen über das Wasser oder das Futter den Tieren verabreicht werden, da dies die normalen Aufnahmewege in der Natur sind. Ein weiterer kritischer Faktor ist der Expositionszeitraum, da viele niedere Wirbeltiere ihr Geschlecht während eines relativ kurzen Entwicklungszeitfensters ausdifferenzieren. Eine Exposition während dieses Zeitraumes hat irreversible Effekte zur Folge (Sumpter 1997).

Weitergehend fordern Toft & Baatrup (2001), dass neben den vielen bestehenden molekularen Endpunktmethoden, die einen Hinweis auf die Aktivität verschiedener Umweltchemikalien geben können, Biomarker auf höheren Organisationsebenen entwickelt werden müssen. Dadurch können Informationen über die Effekte auf die Reproduktionsbiologie des Individuums und im idealen Fall auf die Population gewonnen werden. In ihren Untersuchungen mit Guppies (*Poecilia reticulata*) etablierten sie Biomarker auf fünf Organisationsebenen: Zuerst untersuchten sie die Vitellogeninsynthese nach ED-Exposition auf der molekularen Ebene. Auf zellulärer Ebene wählten sie die Veränderung der Spermienanzahl als Biomarker und auf der Organebene untersuchten sie das Gonadengewicht. Auf der Ebene des individuellen Organismus wurde das Paarungsverhalten und die sexuelle Reifung der Jungfische untersucht und schließlich spiegelte der Reproduktionserfolg unter ED-Einfluss Effekte auf der Populationsebene wider.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im sogenannten Einzelstoffansatz eine umfassende Charakterisierung einer bestimmten Substanz (BPA) im Sinne der Forderungen der oben aufgeführten Autoren durchge-

führt. Dabei wurden als Endpunkte die individuelle Sexualdifferenzierung, die Entwicklung der Gonaden und der Zellen des Gonadengewebes sowie die Expression eines molekularen östrogenen Biomarkers (ER-mRNA) in Kaulquappen von *Xenopus laevis* gewählt und damit die Organismus-, Organ-, zelluläre und molekulare Ebene untersucht. Zusätzlich erfolgte die Exposition mit BPA *in vivo* über das Wasser und während der gesamten Larvalentwicklung oder während der für die Sexualdifferenzierung empfindlichen Entwicklungsphase.

4.1.2 Amphibien als Modellorganismen zur Untersuchung von ED

Xenopus laevis ist ein geeignetes Studienmodell zum Nachweis hormoneller Wirkungen von Umweltchemikalien, da zum einen sein endokrines System eine hohe Ähnlichkeit mit dem der landlebenden Vertebraten aufweist, was die Relevanz der Ergebnisse, die mit diesem Testsystem erzielt werden, erhöht. Zum anderen eignet sich die aquatische Lebensweise für Untersuchungen zur Wirkung von ED, da diese sich in Oberflächengewässern anreichern und von im Wasser lebenden Tieren leicht aufgenommen werden können. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Larvalentwicklung zu, die bei Amphibien im Wasser verläuft und einen besonders sensiblen Entwicklungsabschnitt für exogene Einflüsse darstellt.

Im Gegensatz zu Säugetieren besitzt die Mehrheit der Anuren keine heteromorphen Geschlechtschromosomen. Bei *Xenopus laevis* wurde festgestellt, dass die Weibchen heterogametische Anlagen haben. Die Geschlechtschromosomen werden bei *X. laevis* mit WZ / ZZ bezeichnet. Zusätzlich besitzen bis auf eine Art – *Xenopus tropicalis* – Frösche aus der Gattung *Xenopus* einen tetraploiden Chromosomensatz (36 Chromosomen), was zu mehrfachen Genexpressionen führen kann (GRAF 1989a). Dennoch kann *X. laevis* als funktioneller diploider Organismus betrachtet werden, da während der Meiose nur Bivalente auftreten. Außerdem ist der Karyotyp von *X. laevis* diploid-ähnlich organisiert und es wurde herausgefunden, dass die große Komplexität des *X. laevis* Genoms ihre Ursache in einer Verdoppelung des Genoms und nicht in Tandem-Mutationen hat (GRAF 1989b). Bis heute ist kein Markergen zur genotypischen Geschlechtsbestimmung bei *X. laevis* bekannt, so dass Auswirkungen auf die Sexualdifferenzierung nur anhand statistischer Vergleiche der erhaltenen Phänotypen von behandelten Kaulquappen und von Kontrolltieren möglich sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bestätigen die Verwendbarkeit des Modellorganismus *Xenopus laevis* zur Untersuchung der Wirkungen von ED (KLOAS ET AL. 1999; LUTZ & KLOAS 1999; KLOAS 2002). Amphibien stellen eine unterrepräsentierte Tiergruppe im Bereich der ED-Forschung dar, obwohl sie als klassische Tiermodelle in der Entwicklungsbiologie und Endokrinologie bekannt sind. Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist beispielsweise ein bevorzugter Testorganismus zur Untersuchung von Prozessen der Sexualentwicklung, womit er zum allgemeinen Verständnis der Gonadenentwicklung in Wirbeltieren beitrug (HAYES 1998). Gonadenentwicklung und Sexualdifferenzierung in *X. laevis* sind gute Endpunkte bei der Untersuchung von Verweiblichungsprozessen von ED: Die primäre Geschlechtsdifferenzierung in den Kaulquappen wird durch eine indifferente Gonadenphase eingeleitet und endet in der Organdifferenzierung zu Ovarien und Hoden. Ovarien- und Hodengewebe sind mit bloßem Auge bzw. Binokular nicht zu unterscheiden, bevor die Kaulquappen Entwicklungsstadium 55 erreicht haben. Es konnte gezeigt werden, dass die sensitivste Phase zur Induktion einer Geschlechtsveränderung in *X. laevis* zwischen den Stadien 50 und 52 liegt (MIYATA ET AL. 1999). Eine Behandlung mit exogenen Sexualsteroiden in dieser Entwicklungsphase verändert die genetisch determinierte Ausprägung des Geschlechts der Tiere (HAYES 1998; BÖGI ET AL. 2002; KLOAS 2002).

Das Phänomen der Geschlechtsveränderung bei Kaulquappen von *X. laevis* wurde entdeckt, als WITSCHI & ALLISON (1950) Kaulquappen während der Gonadendifferenzierungsphase mit E2 behandelten. Sie beobachteten, dass sich alle behandelten Kaulquappen zu fruchtbaren Weibchen entwickelten. Die Annahme, dass das erwartete Geschlechterverhältnis 1 : 1 sein müsste, führte zu der Schlussfolgerung, dass die Hälfte der phänotypischen Weibchen genotypische Männchen sein mussten. Folglich war E2 dazu in der Lage, in genetischen Männchen einen weiblichen Phänotyp entstehen zu lassen. Schon diese frühen Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass Veränderungen im Verhältnis der endogenen Sexualsteroiden das genetische Programm zur Geschlechtsbestimmung überlagern können (KELLEY 1996; Bögi ET AL. 2002; KLOAS 2002).

4.1.3 Einfluss von BPA auf die Sexualentwicklung von *Xenopus laevis*

Die Östrogenität von BPA ist bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt. Zu dieser Zeit veröffentlichten DODDS & LAWSON (1936) eine Studie, in der sie Ratten mit BPA behandelten. Dabei stellten sie fest, dass BPA das Uteruswachstum in den Tieren stimulierte. Inzwischen wurde BPA intensiv als Testsubstanz in vielen *in vitro*- und *in vivo*-Studien eingesetzt und es wird allgemein anerkannt, dass BPA mit E2 um die Bindung an den ER konkurrieren kann, obwohl seine Struktur wenig Ähnlichkeiten mit der von E2 hat (vgl. **Abb. 2-1**). Uneinigkeit herrscht allerdings in der Frage nach der Bioaktivität von BPA und dabei hauptsächlich in der Frage nach seinem Potenzial, in niedrigen Konzentrationen östrogenähnliche Wirkungen zu vermitteln (BEN-JONATHAN & STEINMETZ 1998).

Diese wissenschaftliche Kontroverse betraf auch unsere Arbeitsgruppe, denn in einer anderen Studie zu *in vivo*-Effekten von BPA auf die Geschlechtsdifferenzierung von *X. laevis* Kaulquappen wurden keine Verweiblichungsphänomene festgestellt (PICKFORD ET AL. 2003), im Gegensatz zu den ursprünglich von KLOAS ET AL. (1999) veröffentlichten Ergebnissen, in denen BPA signifikant verweiblichend wirkte. Folglich sollte mit der Verwendung von BPA im Einzelstoffansatz dieser Arbeit sowohl eine umfassendere Untersuchung zur Verifizierung der Wirkungen einer umstrittenen Chemikalie als auch der Nachweis der Umweltbelastung mit dieser Chemikalie durchgeführt werden.

Für die Expositionsversuche wurde ein semistatisches Behandlungsregime eingerichtet, das sich bereits früher als eine nützliche Methode zur Untersuchung von ED und deren Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung herausstellte (KLOAS ET AL. 1999). Im Gegensatz dazu wurden die Untersuchungen von PICKFORD ET AL. (2003) mit einer Durchflussanlage durchgeführt, wobei keine Effekte von BPA auf die Sexualentwicklung festgestellt wurden. Gleichzeitig blieb auch die als Positivkontrolle verwendete E2-Behandlung der Tiere in letztgenannter Studie hinter den zu erwartenden Verweiblichungseffekten zurück. Das Behandlungsregime scheint folglich eine Rolle für die Wirksamkeit einer Substanz zu haben.

Der erste Expositionsansatz diente der Bestätigung der Ergebnisse von KLOAS ET AL. (1999), indem mit der gleichen Vorgehensweise eine signifikante Verweiblichung bei einer Behandlung der Tiere mit BPA 10^{-7} M erzielt werden konnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass E2 im semistatischen Behandlungsregime als Positivkontrollsubstanz verwendet werden kann (LEVY ET AL. 2004a).

Die effektivste BPA-Konzentration lag auch im zweiten Expositionsansatz bei 10^{-7} M. Die Wirkungen der nächsthöheren und nächstniedrigeren Konzentrationen (10^{-6} M und 10^{-8} M) waren weniger deutlich und uneinheitlich. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit neueren Ergebnissen zu kontrovers diskutierten Wirkungen von ED in geringen Konzentrationen (sogenannte „low-dose effects“), die zeigten, dass einige ED eine zweiphasige, U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung hervorrufen (CALABRESE 2001). Die Bedeutung der U-förmigen Wirkungskurven konnte in weiteren Studien verstärkt beleuchtet werden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass einige ED störende Effekte bei Konzentrationen bewirkten, die unterhalb der Wirkungsgrenze in toxikologischen Studien lag. Es ist also angebracht, beim Vorhersagen von Grenzwerten vorsichtig zu sein, denn es könnten ökologisch relevante hormonstörende Effekte in Konzentrationen auftreten, die nicht mehr untersucht oder als gefahrlos für Mensch und Umwelt definiert wurden (WELSHONS ET AL. 1999).

Eine mögliche Ursache für das Auftreten zweiphasiger Dosis-Wirkungs-Beziehungen ist, dass in Lebewesen eine bestimmte Schwellenkonzentration überschritten werden muss, bevor eine physiologische Reaktion im Organismus auftritt. Beim Überschreiten der wirksamsten Konzentration werden dann Metabolisierungs- und Ausscheidungsprozesse aktiviert, welche die Reaktionen wieder verlangsamen oder unterdrücken können. Im Falle von BPA zeigte eine jüngst veröffentlichte Studie, dass in Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) eine geringere Sensibilität für die östrogenen Wirkungen von BPA in hohen Konzentrationen als in niedrigen vorliegt. Dies könnte auf eine erhöhte Metabolisierungsrate von BPA zurückgeführt werden, nachdem die Aktivität von Entgiftungsenzymen gesteigert wurde (LINDHOLST ET AL. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde wiederholt ein Verweiblichungseffekt bei einer Konzentration von 10^{-7} M BPA festgestellt. Die Wirkungen der höheren (10^{-6} M) und niedrigeren Konzentration (10^{-8} M) waren uneinheitlich und zeigten nur tendenziell eine Verweiblichung. Möglicherweise liegt auch hier das Überschreiten einer Schwellenkonzentration und das Einsetzen einer erhöhten Metabolisierungsaktivität vor. Allerdings liegen noch keine Informationen zum Metabolismus von BPA in *Xenopus laevis* Kaulquappen vor. Weiterführende Studien zur Klärung dieser Frage sind geplant.

BPA bewirkte in den eingesetzten Konzentrationen im zweiten Expositionsansatz (10^{-6} bis 10^{-8} M) keine signifikante Änderung des Körpergewichtes der juvenilen Frösche im Vergleich mit den Kontroll- oder Positivkontrolltieren. In der vorliegenden Studie scheint BPA nicht in Wachstums- oder Metamorphoseprozesse einzugreifen. Ob BPA die Organentwicklung

beeinträchtigen kann, wurde durch morphologische und histologische Untersuchungen der Gonaden festgestellt.

Die Unterscheidung in Hoden und Ovarien nach einer Behandlung mit BPA sagt noch nichts über die tatsächliche Funktionsfähigkeit der Gonaden aus. Es besteht die Möglichkeit, dass ein morphologisch intakter Hoden nicht funktionsfähig ist, wenn er zum Beispiel zelluläre Fehlentwicklungen aufweist. Diese ED-induzierten Fehlentwicklungen sind inzwischen aus Hoden und Ovarien bekannt (GRAY & METCALFE 1997; YOKOTA ET AL. 2000). Bei der Betrachtung von Verweiblichungseffekten spielt der sogenannte Ovo-Testis-Zustand eine Rolle. Dieser Zustand beschreibt das Vorkommen von Oocyten bzw. Follikeln im Hodengewebe. Ovo-Testes wurden in einigen gonochoristischen Fischarten sowohl im Labor als auch im Freiland gefunden (JOBILING ET AL. 1998; YOKOTA ET AL. 2000).

In Amphibien ist der Ovo-Testis- oder Zwitterzustand nicht zwangsläufig eine Fehlentwicklung, da er in einigen Arten einen Zwischenzustand im Verlauf der Sexualentwicklung darstellt. So bildet der Grasfrosch (*Rana temporaria*) einen Zwitterzustand aus, bevor er Ovarien entwickelt (WALLACE ET AL. 1999). Das Auftreten von Ovo-Testes in *X. laevis* ist sehr selten dokumentiert (HAYES ET AL. 2002; Bögi ET AL. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde das Hodengewebe auf Abnormalitäten untersucht. Von 360 Hodenproben enthielten nur zwei im Gewebe Oocyten, so dass die Schlussfolgerung gezogen werden muss, dass dieser Zustand bei *Xenopus laevis* nur zufällig auftritt, da weniger als 1 % der untersuchten Gewebe betroffen waren. Diese Aussage wurde in einem Expositionsexperiment, das in einem anderen Labor durchgeführt wurde, bestätigt (Bögi ET AL. 2003). Somit kann zusammengefasst gesagt werden, dass die Änderung des Geschlechts vom Männchen zum Weibchen vollständig und endgültig ist, was in Expositionsexperimenten mit *X. laevis* Kaulquappen zu klaren Ergebnissen führt, weshalb diese zur Untersuchung von Verweiblichungseffekten geeignet sind.

Von BPA ist bekannt, dass es an den *X. laevis* ER bindet (LUTZ ET AL. 1999) und östrogene Aktivität in primären Leberzellkulturen zeigt (KLOAS ET AL. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte eine kurzzeitige Exposition (14 Tage, Kaulquappen ab Entwicklungsstadium 50) mit BPA demonstrieren, dass die ER-mRNA-Transkription in den Tieren erhöht wurde. Damit wurde gezeigt, dass BPA *in vivo* über eine ER-vermittelte Wirkungsweise auf die Sexualdifferenzierung einwirkt.

Der ER kann in *X. laevis* als östrogener Biomarker verwendet werden, weil er durch positive Rückkopplungsmechanismen seine eigene Synthese reguliert. Diese Erkenntnis wurde gewonnen, indem in männlichen Lebern von *X. laevis* gezeigt wurde, dass die Anzahl der Östrogenrezeptoren nach einer E2-Behandlung von 100 – 200 Molekülen pro Leberzelle auf ungefähr

1 500 in den E2-stimulierten Zellen anstieg (CORTHÉSY ET AL. 1990). VARRIALE & TATA (1990) stellten fest, dass innerhalb von 48 Stunden in einer Ovarienzellkultur der ER-Gehalt nach Behandlung mit 10^{-7} M E2 um das Vierfache anstieg. Zur Geschlechtsdifferenzierung müssen Östrogenrezeptoren vorhanden sein, so dass der Nachweis der ER-mRNA-Expression in Kaulquappen den Einfluss östrogenartiger Substanzen verdeutlichen kann.

Im Gegensatz dazu kann in Kaulquappen Vitellogenin nur eingeschränkt als Biomarker benutzt werden, da die Vitellogenin-mRNA während der Larvalentwicklung nicht vor dem Entwicklungsstadium 62 nachweisbar ist, also nachdem durch die Metamorphose eine Leber mit adulten Merkmalen entwickelt wurde (MAY & KNOWLAND 1981; BÖGI ET AL. 2002). Untersuchungen zum Einfluss von ED auf die frühen Entwicklungsstadien bei *Xenopus laevis* lassen sich deswegen besser mit dem ER als Biomarker realisieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Synthese von ER-mRNA um mehr als das Doppelte in behandelten Kaulquappen ansteigt, wenn die Tiere 2 Wochen mit 10^{-7} M BPA während der sensitiven Gonadendifferenzierungsphase behandelt wurden. Dieses Ergebnis demonstriert, dass BPA *in vivo* ebenso eine Wirkung ausübt wie *in vitro* und die Induktion der Synthese der ER-mRNA über eine Bindung von BPA an den ER erfolgt.

Eine Bindung an den ER ist eine grundlegende Voraussetzung dafür, dass rezeptorvermittelte Effekte auftreten, die bei geringeren Konzentrationen wirksam sind als die, die für direkte, zum Teil toxische, Wirkungen auf Organe, Zellen oder Enzyme erforderlich sind. Es muss kritisch bemerkt werden, dass eine Erhöhung der mRNA-Transkription nur bedingt mit einer Erhöhung der Synthese des funktionellen Proteins korreliert werden kann, da die Regulation der Proteinexpression meist auf translationalem oder posttranslationalem Wege geschieht (FIELDEN & ZACHAREWSKI 2001).

Die festgestellten wirksamen Konzentrationen von BPA sind umweltrelevant, so dass diese Ergebnisse eine Grundlage für eine Risikoabschätzung der Gefahren für Mensch und Umwelt durch BPA ermöglichen. Bezogen auf freilebende Amphibienpopulationen stellt eine kurzzeitige Exposition während eines empfindlichen Entwicklungsstadiums ein realistisches Umweltszenario dar. Da viele Arten in verschiedenen Wasserhabitaten laichen, kommt es vor, dass diese Habitate von landwirtschaftlichen oder industriellen Abwässern belastet werden. Folglich können Kaulquappen während einer bestimmten Zeit ihrer Ontogenese den Abwasserinhaltsstoffen ausgesetzt sein. Einige dieser Substanzen sind schnell abbaubar, so dass eine kurzzeitige Exposition regelmäßig auftreten kann (BRIDGES 2000). In Zeiten weltweit zurückgehender Amphibienpopulationen stellen komplexe Laborstudien über die Effekte von ED auf Amphibien wichtige Ergebnisse zur Verfügung, denn Sub-

stanzen mit hormonähnlichem Wirkpotenzial tragen vermutlich zum Populationsrückgang der Amphibien bei (CAREY ET AL. 2001).

4.1.4 Chemische Analyse von BPA in den Expositionsversuchen und in Gewässerproben

Im vorangegangenen Kapitel wurden die *in vivo*-Effekte von BPA auf *Xenopus laevis* Kaulquappen umfassend diskutiert. Um die Frage nach dem Vorkommen von BPA in der Umwelt beantworten zu können, musste für diese Chemikalie eine analytische Nachweismethode entwickelt werden. Dabei bot sich an, Wasserproben aus den Expositionsexperimenten zu analysieren. Zum einen war dadurch die Möglichkeit der Entwicklung einer chemisch-analytischen Methode im Labormaßstab gegeben, zum anderen konnte eine Überprüfung der BPA-Behandlung und der Abbaurate des BPA im semistatischen Versuchsansatz stattfinden. Die Analyse wurde mit Hilfe einer HPLC-Trennung durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der BPA-Gehalt im Untersuchungswasser zu Beginn und am Ende eines Expositionsintervalls (48 Stunden-Zeitraum) analysiert. Dabei zeigte sich, dass BPA nach 48 Stunden noch zu 15 – 30 % der Nominalkonzentration vorhanden war. Um weitergehende Informationen darüber zu erhalten, welches Abbauverhalten BPA in den 48 Stunden zeigte, wurde in Abständen von 6 Stunden in unterschiedlichen Ausgangsproben die BPA-Konzentration gemessen. Es wurde nur eine geringe Verringerung der BPA-Mengen in Becken nachgewiesen, die nur das Standardmedium oder Standardmedium und Kaulquappenfutter enthielten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass BPA kaum durch Mikroorganismen metabolisiert wurde, die sich in den Becken ansiedelten oder möglicherweise das Futter als Nährstoffquelle benutzten.

Die Meinungen zur mikrobiellen Abbaubarkeit von BPA gehen weit auseinander. Während einige Studien eine schnelle Degradierung von BPA mit Halbwertszeiten von weniger als 4 Tagen zeigten (DORN ET AL. 1987; KLECKA ET AL. 2001; WEST ET AL. 2001), führten andere Untersuchungen zum Ergebnis, dass BPA eine gewisse Persistenz gegenüber Abbauprozessen hatte (STONE & WATKINSON 1983). Ein schneller BPA-Abbau benötigt genügend adaptierte Mikroorganismen, wie sie zum Beispiel im Auslaufwasser von BPA-produzierenden Firmen nachzuweisen sind (FÜRHACKER ET AL. 2000).

Die Ergebnisse der chemischen Analyse zeigten außerdem, dass BPA aus dem Standardmedium von den Kaulquappen aufgenommen worden sein muss, da die BPA-Konzentration nur in Anwesenheit von Kaulquappen eindeutig erniedrigt wurde. Allerdings gibt es keine aktuellen Informationen, die sich auf die Aufnahme, Metabolisierung oder Exkretion von BPA in Anuren-Kaulquappen beziehen und damit diese Vermutung stützen könnten, so dass weiterer Forschungsbedarf in dieser Richtung besteht.

Die gerade angesprochene HPLC-Methode erwies sich als ungeeignet für das analytische BPA-Screening von Umweltgewässerproben. Die Ursache dafür war, dass trotz einer durchgeführten Fraktionierung der Albextrakte die Vielzahl der Inhaltsstoffe in den Extrakten die HPLC-Trennsäule verstopften und eine Auftrennung unmöglich machten. Aus diesem Grund musste eine weitere analytische Methode entwickelt werden, die sich auf eine GC / MS-Technik stützte. Diese Methode lieferte gute Ergebnisse bezüglich des Nachweises von BPA aus Gewässerproben, die aus der Alb oder aus Kläranlagenausläufen stammten. Die ermittelten Messwerte zeigten, dass BPA im Flussverlauf der Alb durchgehend vorhanden war. Die BPA-Konzentrationen bewegten sich zwischen 2 und 4 ng / L. Erst das Auslaufwasser der Kläranlage Neureut beinhaltetete 16 ng / L BPA und die Probenahmestelle flussabwärts des Auslaufkanals enthielt ebenfalls noch eine erhöhte BPA-Konzentration von 8 ng / L. Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit Daten aus weltweit durchgeführten Untersuchungen des BPA-Gehalts in anthropogen belasteten Oberflächengewässern bzw. in Kläranlagenauslaufwasser überein und belegen eine moderate Belastung der Alb mit BPA.

So wurden zum Beispiel in Kläranlagenauslaufwasser in Berlin BPA-Konzentrationen zwischen 8 und 33 ng / L gefunden (HANSEN 1997). In der Elbe wurden neben anderen ED auch BPA (höchste Konzentration: 5 ng / L) nachgewiesen (HECKER ET AL. 2002). WENZEL ET AL. (1998) fanden in deutschen Oberflächengewässern geringe BPA-Mengen von 23 ng / L. In Kläranlagenausläufen wurden jedoch bis zu 702 ng / L detektiert. Diese Autoren nehmen an, dass der Eintrag von BPA über Kläranlagenausläufe der Haupteintragspfad in Oberflächengewässer ist. Sehr hohe Konzentrationen von BPA werden auch durch die Abwässer von BPA-synthetisierenden bzw. -verarbeitenden Firmen in Oberflächengewässer eingeleitet (bis zu 118 µg / L, FÜRHACKER ET AL. 2000). In Japan wurde in einer großangelegten Studie die Gewässerbelastung mit BPA untersucht. In 88 von 130 Probenahmestellen wurde BPA nachgewiesen und die höchste gefundene Konzentration betrug 940 ng / L (HU ET AL. 2002).

In der vorliegenden Arbeit betrug die in den Expositionsversuchen wirksamste BPA-Konzentration 10^{-7} M, was 22,23 µg / L entspricht. Somit sollten

die aufgeführten Werte in Oberflächengewässern und auch die Werte, die im Flussverlauf der Alb gefunden wurden, nicht ausreichen, um vergleichbare Effekte auszulösen. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass möglicherweise additive oder synergistische Effekte von einem ED-Gemisch hervorgerufen werden können, die sich aus für die Substanzen alleine unwirksamen Konzentrationen zusammensetzen.

Dennoch sind die gemessenen BPA-Konzentrationen im Auslaufwasser der Kläranlage Neureut nur noch ca. zwei Zehnerpotenzen geringer als der in der vorliegenden Arbeit festgestellte NOEC-Wert (no observed effect level), der bei 10^{-8} M (2,23 µg / L) liegt. Eine Risikoabschätzung muss zumindest im Bereich des Auslaufkanals der Kläranlage die möglichen Folgen für die dort lebenden aquatischen Organismen in Betracht ziehen.

4.2 UMWELTBELASTUNG MIT ED – GEMISCHANSATZ

4.2.1 ED in der Umwelt als komplexes Gemisch von Stoffen mit verschiedenen Wirkmechanismen

Die im Einzelstoffansatz untersuchte Chemikalie BPA wirkt ähnlich wie weibliche Sexualsteroiden. Eine Studie mit einer einzelnen Substanz erfasst die Situation in einem komplexen System wie einem Oberflächengewässer nur unzureichend. Da sich in der Umwelt ED nachweisen lassen, die über mehrere Wirkmechanismen auf die Reproduktionsbiologie von aquatischen Organismen einwirken können. Es handelt sich um vier prinzipielle Wirkmechanismen, mit denen östrogene, antiöstrogene, androgene und antiandrogene Effekte verursacht werden können (DÖHLER & NEW 1989). Dabei führen östrogene Substanzen zur Verweiblichung, androgene zur Vermännlichung, antiöstrogene neutralisieren die sexuelle Differenzierung und antiandrogene Stoffe haben ebenfalls verweiblichende Effekte zur Folge (KLOAS 2002).

Es ist zur Zeit eine kontrovers diskutierte Frage, ob diese generelle Einteilung auch bei Amphibien zutrifft, da es Untersuchungen gibt, die gegensätzliche Ergebnisse hinsichtlich der Geschlechtsdifferenzierung bei Amphibien zeigten (HAYES 1998; WALLACE ET AL. 1999; KLOAS 2002; BÖGI ET AL. 2003). Nur Östrogene erzeugten immer eine eindeutige Verweiblichung, Vermännlichung aufgrund von Androgenen scheint abhängig von der Amphibienart bzw. -ordnung zu sein, wobei die widersprüchlichen Resultate zum

Teil auf unvergleichbaren Expositionsansätzen beruhen. Bisher wurden Effekte von Antiöstrogenen und Antiandrogenen bei Amphibien sehr selten untersucht (KLOAS 2002), so dass ein Bedarf an weiteren Untersuchungen besteht, um die generalisierte Aussage zu den Wirkmechanismen für Amphibien zu bestätigen.

Die meisten Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie die Reproduktionsbiologie beeinflussen, sind wie die Sexualsteroid lipophil. In Oberflächengewässern wurden verschiedene Stoffklassen in relevanten Konzentrationen gefunden. Dazu gehören die natürlichen Sexualsteroid, synthetische Steroid wie Kontrazeptiva, antiöstrogene Brustkrebswirkstoffe, Anabolika, Phytoöstrogene, Mycoöstrogene, Umweltchemikalien, Insektizide, Pestizide und Fungizide (KOLPIN ET AL. 2002). Diese Vielzahl an Substanzen in der Umwelt erlaubt es nicht, Wirkungen aufgrund der chemischen Struktur vorauszusagen, da die Struktur eines potenziellen ED nur bedingt Rückschlüsse auf seine Wirkung zulässt. Ein vielversprechenderer Ansatz ist die Unterscheidung zwischen den angesprochenen vier Wirkmechanismen, die durch adäquate biologische Testsysteme festgestellt werden können, und diese mit chemischen Analysemethoden zu verbinden.

Dieser Gedanke wurde mit dem Gemischansatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgt. Dazu wurde in Rezeptorbindungsstudien (ER und AR) festgestellt, ob Inhaltsstoffe von Gewässerextrakten der Alb an die Rezeptoren binden. Weiterhin wurde durch Behandlung von *X. laevis* Leberzellkulturen mit Gewässerextrakten und dem Nachweis der Expression eines östrogenen Biomarkers (ER) und eines summarischen (anti)östrogenen / (anti)androgenen Biomarkers (RBP) untersucht, ob die entsprechende Biomarkerexpression beeinflusst wurde. Im Gegensatz zum Einzelstoffansatz handelte es sich um *in vitro*-Methoden. Die mit diesen Methoden erzielten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.2.2 Untersuchungen der Gewässerproben mit ausgewählten Bioassays

Die Extrakte der Gewässerproben wurden aufkonzentriert und fraktioniert in den Bioassays eingesetzt. Diese Vorgehensweise lässt sich folgendermaßen begründen: Bei der Auswahl der entsprechenden Umweltmatrix wurde der fließende Wasserkörper der Alb gewählt. Dadurch müssen alle ED unentdeckt bleiben, die sich in den Flusssedimenten befinden oder die assoziiert

mit pflanzlichem Material oder Huminstoffen (vgl. STEINBERG ET AL. 2003) im Wasserkörper zu finden sind, denn diese wurden herausgefiltert.

Weiterhin beträgt der gesamte DOC-Gehalt (dissolved organic carbons) im Wasserkörper eines Gewässers meistens weniger als 10 mg / L (THURMAN 1985) und die Massenkonzentrationen der entsprechenden Schadstoffe liegen im Bereich von ng / L bis µg / L, was weniger als 1 Promille vom Gesamt-DOC ausmacht. Folglich ist eine Anreicherung der ED durch Aufkonzentrierung unerlässlich. Schließlich sind Fraktionierungen erforderlich, um die Komplexität des ursprünglichen Stoffgemisches zu verringern. Zur Fraktionierung werden im Allgemeinen verschiedene Substanzeigenschaften ausgenutzt, im vorliegenden Fall erfolgte eine Fraktionierung aufgrund der unterschiedlichen Lösungseigenschaften der ED in unterschiedlich polaren Lösungsmitteln. Eine alternative Fraktionierungsmethode ist die von MÜLLER & FRIMMEL (2001) entwickelte Ultrafiltrationsfraktionierung, mit der die Bestandteile nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Es muss bei jeder gewählten Gewässerextraktions- und Fraktionierungsmethode generell berücksichtigt werden, dass nach der Probenaufarbeitung die Zusammensetzung der ED im Extrakt qualitativ und quantitativ nicht mehr exakt der Originalgewässerprobe entsprechen muss.

4.2.2.1 Rezeptorbindungsstudien mit Albextrakten

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass mit dem Modellorganismus *Xenopus laevis* erfolgreich Rezeptorbindungsstudien durchgeführt werden konnten. Dabei wurden definierte Substanzen in Konkurrenzexperimenten eingesetzt. Alle untersuchten östrogenartigen ED (Tetrachlorobiphenyl, Dibutylphthalat, Butylhydroxyanisol, Nonylphenol, BPA, Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT)) zeigten eine relativ geringe Bindungsaffinität an die cytosolischen Östrogenrezeptoren. Einzig der natürliche Ligand E2, sowie EE und Tamoxifen konnten das radioaktiv markierte E2 äquivalent vom Rezeptor verdrängen. Im Gegensatz dazu hatten z.B. Nonylphenol und BPA eine 1000-fach geringere Bindungsaffinität an den ER als E2 (LUTZ & KLOAS 1999).

Rezeptorbindungsstudien zur Untersuchung der Bindung bestimmter Substanzen an den AR wurden in Amphibien bisher nicht durchgeführt. In Vorversuchen wurde ein Radiorezeptorassay (RARA) für Androgenrezeptoren aus *X. laevis* entwickelt, in dem [³H]-T als markierter Ligand eingesetzt wurde. T, DHT und MT konnten diesen vom Rezeptor äquivalent verdrängen, die Antiandrogene VC und p,p'-DDE zeigten kein Verdrängungspotenzial.

Diese Substanzen sind dafür bekannt, den AR durch allosterische Hemmung zu blockieren und nicht als Ligand aufzutreten (KELCE & WILSON 1997).

Beide RARA-Ansätze kamen in dieser Arbeit zum Einsatz, um die Bindungsaffinität von Gewässerinhaltsstoffen an die Rezeptoren zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass das Bindungspotenzial der Extrakte im Flussverlauf der Alb ansteigt. Weiterhin konnte dokumentiert werden, dass in den Kläranlagenauslaufextrakten Inhaltsstoffe mit dem größten Interaktionspotenzial mit den Rezeptoren zu finden sind. Im Fluss werden diese Stoffe entsprechend verdünnt, so dass nur geringere Bindungsaffinitäten an beide Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich der E2- mit den T-Äquivalenten fällt auf, dass das Auslaufwasser der Kläranlage Neurod (Alb 2) eine höhere Konzentration an E2-Äquivalenten als an T-Äquivalenten aufweist. Bei der Kläranlage Neureut (Alb 5) verhält es sich genau anders herum. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Konzentrationen der entsprechenden Hormonäquivalente abhängig vom Abwasserzulauf der jeweiligen Kläranlagen sind. Da die Kläranlage Neurod nur kommunales Abwasser bearbeitet, verwundert es nicht, dass im Verhältnis mehr E2-Äquivalente zu finden sind. Kommunales Abwasser enthält einen großen Teil natürlicher weiblicher Sexualsteroiden sowie synthetische Östrogene wie EE, die als Bestandteil von Verhütungsmitteln verwendet werden (KÖRNER ET AL. 2001).

Die durchgeführten Rezeptorbindungsstudien lassen keine Entscheidung darüber zu, ob eine Substanz, die an den Rezeptor bindet, auch tatsächlich ein Rezeptoragonist ist und damit eine direkte Wirkung über eine Rezeptorbindung vermittelt. Es könnten auch antagonistische ED an den Rezeptor binden, die diesen dann blockieren und dadurch einen Einfluss auf rezeptorgesteuerte Regulationsprozesse haben.

Neben den angesprochenen natürlichen Östrogenen können in Umweltproben auch sogenannte Phytoöstrogene vorkommen. Unter einem Phytoöstrophen wird eine pflanzliche Substanz verstanden, die strukturell und / oder funktional den Östrogenen ähnelt. Die zwei Hauptklassen der Phytoöstrogene sind Lignine und Isoflavonoide. Viele Studien haben festgestellt, dass Lignine und Isoflavonoide erfolgreich mit E2 um die Bindung an den ER konkurrieren können. Weiterhin wurde gezeigt, dass Phytoöstrogene nicht nur an Rezeptoren binden, sondern dass auch Gentranskriptionen eingeleitet werden können (WHITTEN & PATISAUL 2001). Phytoöstrogene tragen auch in der Alb zur östrogenen Belastung bei (s. Kapitel 3.3).

Androgene Agonisten des AR in Umweltproben sind unter anderem die endogenen Hormone Testosteron und Dihydrotestosteron sowie die Pharmazeutika Danazol, Methandriol und Methyltestosteron. Als Antiandrogene können verschiedene Pestizide wie Vinclozolin und seine Metabolite M1 und

M2, die DDT-Metabolite p,p'-DDE und o,p'-DDE, das auch in Albextrakten gefunden wurde (s. Kapitel 3.3), sowie die Fungizide Procymidon und Flutamid auftreten (EULING & KIMMEL 2001). Antiandrogene binden ebenfalls an den AR und reduzieren oder verhindern dabei die Androgenantwort. Für VC wurde gezeigt, dass die Metabolite M1 und M2 an Ratten- und Menschenandrogenrezeptoren binden und als AR-Antagonisten wirken. M1 und M2 blockieren die androgenabhängige Genexpression *in vivo* und *in vitro*, indem sie die androgenvermittelte AR-DNA-Bindung verhindern (OSTBY ET AL. 1999).

4.2.2.2 Etablierung von RBP-mRNA als Biomarker

RBP gehört zur Proteinfamilie der Lipocaline. Diese sind eine große Gruppe kleiner extrazellulärer Proteine. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich dadurch aus, dass sie kleine hydrophobe Moleküle binden, an spezifische Membranrezeptoren andocken und Komplexe mit löslichen Makromolekülen bilden können. Die Lipocaline wurden häufig als Transportproteine bezeichnet, es ist jedoch inzwischen bekannt, dass die Lipocaline eine große funktionelle Diversität besitzen und beispielsweise eine Rolle beim Retinoltransport, bei der Farbgebung von Invertebraten, beim Pheromontransport und bei der Prostaglandinsynthese besitzen. Weiterhin werden sie mit verschiedenen Regulationsprozessen in Verbindung gebracht, z.B. bei der Immunantwort, und als Carrierproteine spielen sie eine Rolle bei der Entsorgung exogener und endogener Substanzen (FLOWER 1996).

Das RBP wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und ins Serum ausgeschieden. Sein spezifischer Ligand ist das Retinol (Vitamin A), das hydrophob ist und deswegen an ein Bindungsprotein gebunden zum Wirkungsort transportiert werden muss. Vitamin A spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, im Zellwachstum und in der Zelldifferenzierung. Die RBP-Synthese wird durch Steroidhormone reguliert. Der Verwendung des RBP als Biomarker lag die Hypothese zugrunde, dass diese Regulationsprozesse das RBP zu einem geeigneten Biomarker für den Nachweis von (anti)östrogenen und (anti)androgenen Effekten machen.

McKEARIN ET AL. (1987) fanden heraus, dass Steroidhormone die RBP-mRNA-Transkription regulieren und eine E2-Behandlung von männlichen *Xenopus laevis* erhöhte die Synthese von hepatischer RBP-mRNA um das Zehnfache. Es scheint jedoch, dass die Erhöhung der RBP-Synthese durch Östrogene artabhängig sein könnte, denn eine einzige Behandlung mit E2 verringerte die hepatischen RBP-mRNA-Gehalte in der Goldbrasse (*Sparus aurata*; FUNKENSTEIN 2001).

Die steroidhormonabhängige Regulation des RBP lässt sich dadurch erklären, dass Retinol als ein Retinol-RBP-Komplex in den Oocyten von oviparen Wirbeltieren gespeichert wird. So kann Retinol bei Bedarf dem sich entwickelnden Embryo zur Verfügung gestellt werden (FUNKENSTEIN 2001). Deswegen kann RBP mit dem Vitellogenin, einem anderen Eizellen-Vorläuferprotein, verglichen werden, das ebenfalls unter Regulation der Steroidhormone synthetisiert und in die Eier eingelagert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass die RBP-mRNA-Expression durch E2 und EE in *X. laevis* Leberzellen dosisabhängig erhöht wird, womit die Daten von MCKEARIN ET AL. (1987) bestätigt wurden. Damit eignet sich RBP grundsätzlich als östrogener Biomarker. Es muss aber einschränkend hinzugefügt werden, dass die Höhe der RBP-mRNA-Induktion durch die beiden Östrogene uneinheitlich war. Nur das synthetische Östrogen EE erzeugte eine signifikante Erhöhung der RBP-mRNA-Expression. Das liegt hauptsächlich daran, dass EE im Gegensatz zu E2 sehr stabil ist und damit eine gewisse Abbauresistenz gegenüber Metabolisierungsprozessen zeigt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit früheren Erkenntnissen, in denen eine Halbwertszeit von E2 in *Xenopus laevis* Hepatocyten von 120 min festgestellt wurde, wenn die Zellen mit E2 10^{-6} M behandelt wurden (TENNISWOOD ET AL. 1983). Dadurch erwies sich EE als die sinnvollere Positivkontrolle zur Erhöhung der RBP-mRNA-Synthese.

In einer weiteren Studie entdeckten MCKEARIN & SHAPIRO (1988), dass T in der Lage war, RBP-Gehalte in weiblichen *Xenopus laevis* um das 12-fache zu erniedrigen, womit das Niveau erreicht wurde, das üblicherweise in männlichen Fröschen vorherrscht. Es konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen keine signifikante Erniedrigung der RBP-mRNA-Synthese durch T in Leberzellen nachgewiesen werden. Es scheint jedoch möglich zu sein, dass T und auch DHT die RBP-mRNA-Expression unterdrücken, da eine klare Tendenz zur verminderten Synthese durch diese Substanzen beobachtet wurde. Die fehlende Signifikanz der Ergebnisse lässt sich möglicherweise auf die semiquantitative Erfassung der mRNA-Expression zurückführen. Dabei erfolgte die Analyse der Expressionsverringerng in Bezug auf das Kontrollniveau, das selbst eine relativ geringe RBP-Expression aufwies. Dadurch war die Genauigkeit der Analyse nicht immer gewährleistet und führte zu statistischen Auswertungsproblemen. Die Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode mit spezifischen RBP-Sonden sollte die Genauigkeit des Testsystems erhöhen und wird zur Zeit in unserem Labor etabliert. Weiterhin zeigten Zellen, die mit MT behandelt wurden, eine geringere Tendenz zur Unterdrückung der RBP-mRNA-Expression als T und DHT. MT gilt als potentes synthetisches Androgen, da es relativ abbauresistent und strukturstabil ist. Es sind allerdings keine Daten zum Metabolismus

und zur biologischen Effektivität von MT in Amphibien bekannt, so dass weiterer Klärungsbedarf besteht.

In einem weiteren Experiment wurden die Wirkungen einer kombinierten Behandlung mit verschiedenen Androgenkonzentrationen (T, DHT, MT, jeweils 10^{-9} bis 10^{-6} M) und einer wirksamen EE-Konzentration (10^{-6} M) auf die RBP-mRNA-Synthese untersucht. Die antagonistischen Effekte von Androgenen und Östrogenen konnten eindeutig demonstriert werden, denn sowohl T als auch DHT unterdrückten signifikant die EE-stimulierte Erhöhung der RBP-mRNA-Transkription. Die Androgene waren in diesem Ansatz sogar in relativ niedrigen Konzentrationen (10^{-9} M und 10^{-8} M) effektive Hemmstoffe. Hinsichtlich der Hemmung der RBP-mRNA-Transkription war MT wiederum nicht so wirksam wie T und DHT.

Es lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse zur RBP-Regulation die Hypothese bestätigen, dass RBP-mRNA-Gehalte ein Gleichgewicht zwischen den antagonistischen Regulationseffekten von Östrogenen und Androgenen darstellen (McKEARIN & SHAPIRO 1988). In Bezug auf die Anwendung des RBP als Biomarker zur Untersuchung von Umweltproben bedeutet diese Erkenntnis, dass androgen wirksame ED dadurch erkannt werden können, dass sie die Fähigkeit besitzen, östrogen bedingte Erhöhungen der RBP-mRNA-Expression zu unterbinden.

Diese Aussage trifft auch für antiöstrogen wirksame ED zu. Bei der Behandlung von *X. laevis* Leberzellkulturen mit EE in Kombination mit dem Antiöstrogen TAM, welches alleine keine Wirkung auf die RBP-mRNA-Synthese hat, erfolgte eine signifikante, dosisabhängige Inhibition der EE-bedingten Stimulation der RBP-mRNA-Transkription. Die höchste inhibitorische Wirksamkeit zeigte TAM in äquivalenter Konzentration mit EE (beide 10^{-6} M), wobei die RBP-Gehalte nur noch das Kontrollniveau erreichten. Somit hatte TAM in Kombination mit EE ähnliche regulierende Fähigkeiten wie T und DHT. Im Gegensatz zu diesen beiden Androgenen konnte TAM aber nicht die basale RBP-mRNA-Transkription unterdrücken, so dass es möglich ist, zwischen androgenen und antiöstrogenen Wirkungen von ED zu unterscheiden, indem RBP-mRNA als Biomarker genutzt wird. TAM ist nur ein partieller Antagonist des ER und erzielt dadurch in manchen Fällen keine antiöstrogenen Wirkungen (WIJAYARATNE ET AL. 1999). In Bezug auf die RBP-Regulation in Hepatocyten scheint TAM jedoch ein potentes Antiöstrogen zu sein.

Des Weiteren wurde das Antiandrogen VC den Leberzellen zugegeben. VC alleine erzielte keine Wirkungen auf die RBP-mRNA-Regulation. Eine Kombination von VC 10^{-7} M und 10^{-6} M mit DHT 10^{-6} M hob die transkriptionshemmenden Effekte von DHT auf bzw. die RBP-mRNA-Gehalte erreichten das Kontrollniveau. VC ist dafür bekannt, antiandrogene Wirkungen zu vermitteln. So konnte es bei erwachsenen männlichen Guppies in Konzentra-

tionen von 1 – 10 µg / L eine Entmännlichung hervorrufen (BAARTRUP & JUNGE 2001) und in *Xenopus laevis* Kaulquappen verweiblichend wirken (KLOAS 2002). Von einigen Wissenschaftlern wird vermutet, dass nicht VC selbst das wirksame Antiandrogen ist. So konnten KELCE ET AL. (1994) nachweisen, dass die primären Metabolite M1 und M2 mit den Androgenen um die Bindung an den AR konkurrieren (vgl. 4.2.2.1). Es existieren keine Angaben dazu, ob VC in *X. laevis* Leberzellen metabolisiert wird. Zur Zeit laufende Experimente sollen den Verbleib von VC in unserem Zellkultursystem näher beleuchten und dadurch die verantwortlichen Mechanismen für die Antiandrogenität von VC bei der RBP-Regulation klären. Die vorgestellten klaren Ergebnisse belegen mit den diskutierten Einschränkungen die Anwendbarkeit der RBP-mRNA als antiandrogenen Biomarker.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die RBP-mRNA-Expression von definierten Wirkmechanismen beeinflusst wird und Laborstudien zur Untersuchung von ED mit RBP als Biomarker gestaltet werden können, um (anti)östrogene und (anti)androgene ED-Effekte nachzuweisen. Gerade diese Reaktivität auf alle vier möglichen Wirkmechanismen belegt allerdings, dass RBP bei komplexen Stoffgemischen nur als summarischer Biomarker angewandt werden kann, der die resultierende biologische Wirkung all dieser Mechanismen darstellt (LEVY ET AL. 2004b).

4.2.2.3 Biomarkerexpression in Leberzellkulturen nach Behandlung mit Gewässerextrakten der Alb

Es stellte sich nun die Frage, ob RBP tatsächlich als Biomarker zur Untersuchung der Umweltbelastung mit ED herangezogen werden kann. Da für östrogene Effekte gezeigt werden konnte, dass die Erhöhung des RBP-mRNA-Gehalts durch östrogene Substanzen geringer ausfiel als die des reinen östrogenen Biomarkers ER-mRNA, sollte dieser als spezifischer östrogenen Biomarker bevorzugt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die ER-mRNA ein nützlicher östrogenen Biomarker ist, wenn nur das östrogene Potenzial der drei Kläranlagenauslauffractionen (Alb 5) betrachtet wurde. Es stellt keine Überraschung dar, dass Kläranlagenauslaufwasser östrogene ED enthält, denn es gibt eine Reihe von Studien, die als Hauptkomponenten im Abwasser hohe Konzentrationen von EE, E2, Östron und östrogenähnlichen Chemikalien wie Alkylphenolen und BPA nachwiesen (KÖRNER ET AL. 2001; KIRK ET AL. 2002).

Die Expression der RBP-mRNA in kultivierten Leberzellen, die mit den drei Gewässerextraktfraktionen behandelt wurden, stellt einen Summenpa-

parameter aller (anti)östrogenen und (anti)androgenen Substanzen in den Fraktionen dar. Der Nachweis der RBP-mRNA-Expression nach der Behandlung der Leberzellen mit Fraktionen des Kläranlagenauslaufwassers ergab für alle Fraktionen eine geringere bis ähnliche relative Erhöhung der Expression im Vergleich mit dem östrogenen Biomarker ER-mRNA. Die verminderte RBP-mRNA-Expression im Vergleich zu der stimulierten Expression der Positivkontrolle (EE 10^{-6} M) legt die Vermutung nahe, dass auch androgene Substanzen, welche in allen Fraktionen aufgrund der Ergebnisse der Rezeptorbindungsstudien vorhanden sein müssen, die Synthese hemmen. Hypothetisch könnte dieses relative Absinken der Östrogenität zumindest teilweise auf dem Vorhandensein von antiöstrogenen Stoffen beruhen. Der vergleichende Ansatz im Bioassay mit den Biomarkern RBP- und ER-mRNA deutet darauf hin, dass in der Summe die Effekte der (anti)östrogenen und (anti)androgenen Substanzen, die durch die RBP-mRNA-Expression dargestellt werden, östrogenen Art sind. Da die östrogenen Effekte im Vergleich zur ER-mRNA-Expression eindeutig reduziert auftreten, müssen andere ED in den Proben vorhanden sein, die androgene und eventuell auch antiöstrogene Komponenten im Gemisch repräsentieren. Kürzlich wurde in Großbritannien eine Studie angefertigt, die androgene Aktivität in Oberflächengewässern nachwies und damit die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützt (Thomas *et al.*, 2002).

Die eindeutigsten Effekte wurden mit Fraktionen der Stelle Alb 5 erzielt. Die Probennahmestelle Alb 5 spiegelt die endokrine Wirksamkeit eines Kläranlagenauslaufs wider. Kläranlagenauslaufwasser wird normalerweise stark verdünnt, wenn es in den Vorfluter eingeleitet wird. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Konzentrationen einzelner ED unter die Nachweisgrenze bzw. unter die Grenze der niedrigsten wirksamen Konzentration in einem Bioassay fallen. Trotzdem ist es möglich, wie Beispiele aus Großbritannien zeigen, dass die Flüsse hauptsächlich aus Auslaufwasser bestehen und ED in der Trockenzeit sogar akkumulieren können (HARRIES ET AL. 1997).

Schließlich müssen noch einige offensichtliche Grenzen der Verwendbarkeit von RBP-mRNA als Biomarker zur Untersuchung der Wirkungen von ED genannt werden. Mit Hilfe der RBP-mRNA-Expression lässt sich nicht exakt zwischen antiandrogenen, androgenen, antiöstrogenen und östrogenen Wirkmechanismen unterscheiden. Der große Vorteil bei der Verwendung von RBP-mRNA liegt allerdings darin, dass RBP einen Summenparameter für alle vier Wirkmechanismen darstellt. Dadurch wird die Möglichkeit geboten, alle möglichen Wirkmechanismen von verschiedenen potenziellen ED im Nachweis eines Biomarkers zu vereinen. Es lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob die endokrinen Effekte eines komplexen Gemisches eher in Richtung Verweiblichung oder Vermännlichung tendieren oder ob sie summarisch

nur einen geringen Effekt zeigen. Durch zusätzliche Verwendung eines spezifischen östrogenen (wie hier die ER-mRNA) oder (anti)androgenen Biomarkers können die tatsächlich vorhandenen effizienten Wirkmechanismen charakterisiert und teilweise auch semiquantitativ erfasst werden. Zusätzlich kann durch die Verwendung von Reinsubstanzen in Kombination mit bekannten (anti)östrogenen oder (anti)androgenen Chemikalien der spezifische Wirkmechanismus einer bestimmten Substanz über den Nachweis der RBP-mRNA-Expression ermittelt werden. Zusammengefasst erbringen die Ergebnisse, die mit dem RBP als Biomarker gewonnen wurden, den Beweis, dass RBP-mRNA als Summenparameter für den Nachweis (anti)östrogener und (anti)androgenen Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie dienen und zusätzlich spezifische Wirkmechanismen eines vermuteten ED genauso wie summierte Einflüsse von komplexen Umweltgemischen nachweisen kann.

4.3 BEWERTUNG DER ED-BELASTUNG DER ALB

Die Probenextrakte der Alb wurden auf ihr Potenzial hinsichtlich ihrer endokrinen Wirksamkeit untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass im Oberlauf des Flusses (Alb 0 bis Alb 3) eine relativ geringe Reaktion in den verwendeten Bioassays zu beobachten ist. Eine Ausnahme war dabei die Stelle Alb 2, die einen Kläranlagenauslauf repräsentiert. Dieser zeigte sowohl im RARA als auch in den Biomarkernachweisen eine östrogene Tendenz, wobei auch Substanzen, die an den AR binden nachgewiesen wurden. Im Unterlauf der Alb (Alb 4 bis Alb 6) schien die Belastung des Flusses mit ED erhöht zu sein. Vor allem das Kläranlagenauslaufwasser der Kläranlage Neureut (Alb 5) zeigte in den Untersuchungen ausgeprägte resultierende Östrogenität in den Bioassays. Im weiteren Flussverlauf war dann trotz des Verdünnungseffektes des Flusswassers die Konzentration an potenziellen ED erhöht, denn auch Alb 6 ergab noch eindeutige Ergebnisse in den Versuchen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nur in den Kläranlagenauslaufwassern und im Extrakt der Probe von Alb 6 (Mündungsbereich) eindeutige östrogene Reaktionen in den entsprechenden Bioassays erzielt werden konnten, auch wenn die Ergebnisse der RBP-mRNA-Nachweise belegen, dass zusätzlich androgene und / oder antiöstrogene Substanzen in nicht unerheblicher Menge vorhanden sein müssen.

Dass dies der realen Situation entspricht, belegen die Ergebnisse der chemischen Analytik ausgewählter ED, die neben BPA nachgewiesen werden konnten (vgl. Kapitel 3.3). Hier zeigte sich, dass beispielsweise EE punktuell über die Kläranlagenausläufe in den Fluss gelangt und dadurch auch im Flussverlauf in Konzentrationen von einigen ng / L bis zu ca. 10 ng / L im Mündungsbereich der Alb vorkommt, was aufgrund der extremen Persistenz und biologischen Effektivität von EE gegenüber E2 schon sensitive biologische Wirkungen erwarten lässt (YAMASAKI ET AL. 2002). Der DDT-Metabolit o,p'-DDE mit geringer antiandrogener Wirkung scheint ebenfalls über die Kläranlagen punktuell eingeleitet zu werden. Weitere Beispiele sind die schwachen Phytoöstrogene Campesterol und β -Sitosterol, die eine mehr oder weniger gleichmäßige Belastung des Gewässers aufweisen, ohne in den biologischen Effizienzbereich zu gelangen. Das gleichmäßige Auftreten dieser beiden Substanzen deutet auf natürliche Eintragswege hin (z.B. Laubfall, Wiesenabflusswasser, etc.). Da dies nur ausgewählte Beispiele von ED sind, die mittels chemischer Analytik nachgewiesen werden konnten, muss angenommen werden, dass die Gesamtheit der ED vor allem in Unterlauf der Alb eine Umweltbelastung mit deutlicher biologischer Wirkung darstellt.

Welche Bedeutung haben diese Ergebnisse für die aquatischen Lebewesen in der Alb? Zur Beantwortung dieser Frage muss zuerst festgestellt werden, dass es sich bei den durchgeführten Untersuchungen um Momentaufnahmen von einem bzw. drei Probennahmezeiträumen handelt. Es ist fraglich, ob die Belastung der Alb mit ED im Jahresverlauf konstant ist. Eigene Beobachtungen während der Probennahmen zeigten, dass die Wasserstände der Alb um bis zu 1,50 m variierten, so dass alleine durch Verdünnungseffekte durch das Niederschlagswasser bzw. durch Anreicherung der ED durch hohe Verdunstung Uneinheitlichkeiten der Belastung vorhanden sind. In Ländern mit hoher Bevölkerungsdichte (wie in Deutschland) ist es nicht ungewöhnlich, dass Abwässer einen großen Anteil an der Gesamtwassermenge eines Oberflächengewässers haben. In Großbritannien wurde festgestellt, dass Flüsse zu durchschnittlich 50 % aus Abwässern bestehen, wobei der Anteil in einer Trockenperiode bis auf 90 % ansteigen kann (SUMPTER 1997).

Zusätzlich spielt der Expositionszeitraum in der Natur eine große Rolle. Sowohl die Dauer einer Exposition als auch der Entwicklungsstand der betroffenen Organismen sind wichtige Faktoren bei der Wirkung von ED. Eine Besonderheit kommt bei oviparen Vertebraten noch hinzu: Im Gegensatz zu Säugetieren sind die Eier der Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische eine isolierte, unabhängige metabolische Einheit. Daraus folgt, dass lipophile, persistente Substanzen mit den Eidotterlipoproteinen im Ei angereichert werden können und damit Teil des Umgebungsmilieus des Embryos bis zum

Schlüpfen werden (FOX 2001; BÖGI ET AL. 2002). Bei Oviparen kann also eine Belastung mit ED unabhängig von der tatsächlichen Gewässerbelastung auftreten. Bei Fischen wurde festgestellt, dass diese Art der Exposition häufig bedeutsamer ist als die Exposition durch ED im Wasserkörper. Zusätzlich sind in jungen Entwicklungsstadien die exkretorischen und metabolisierenden Enzyme nur eingeschränkt aktiv, so dass eine kritische Phase der Exposition besteht (VAN DER KRAAK ET AL. 2001).

Weiterhin beleuchten die vorgestellten Ergebnisse hauptsächlich einen Angriffspunkt für ED, nämlich die Bindung an die Steroidrezeptoren bzw. die dadurch hervorgerufene Genexpression. Es gibt jedoch zusätzliche Angriffsmöglichkeiten für umweltrelevante ED in den Organismen. So können Enzyme, die im Syntheseweg der Steroidhormone eine Rolle spielen, Angriffspunkte für ED sein. Besonders Cytochrom P450 Enzyme spielen dabei eine Rolle. Aromatase (CYP19) katalysiert zum Beispiel den letzten, limitierenden Schritt bei der Umwandlung von Androgenen in Östrogene. Es wurde gezeigt, dass Imidazol-ähnliche Fungizide die Aromatase in Mikrosomen von Regenbogenforellen hemmen und dadurch die natürlichen Östrogenantworten unterdrücken, so z.B. die Vitellogenin-Synthese während der Fortpflanzung. Es wird begründet vermutet, dass östrogene und antiandrogene Effekte unter anderem durch eine Erhöhung der Aromataseaktivität zustande kommen, während bei antiöstrogenen und androgenen Effekten die Aktivitätsminderung der Aromatase eine Rolle spielt. Vinclozolin scheint der effektivste Aktivator für die Aromatase zu sein (EULING & KIMMEL 2001). Somit könnte VC einen Teil seiner antiandrogenen Wirkungsweise statt über eine Hemmung der AR-Transaktivierung über eine Erhöhung der Aromataseaktivität erzielen. Dasselbe wurde für p,p'-DDE gezeigt, das die Aromataseaktivität in Rattenlebern *in vivo* erhöhen konnte (SANDERSON ET AL. 2002).

Die Belastung von Oberflächengewässern mit ED wird in der Fachliteratur ebenfalls unterschiedlich bewertet. Eine Studie kam beispielsweise zu dem Ergebnis, dass lediglich das Phytoöstrogen β -Sitosterol in relevanten Konzentrationen von 20 – 56 ng / L gefunden wurde und dieses voraussichtlich natürlichen Quellen entspringt (STUMPF ET AL. 1996). WENZEL ET AL. (1998) führten eine großangelegte Studie in Deutschland durch, in der sie natürliche und synthetische Östrogene fanden, die überwiegend durch die Abwässer der Kläranlagen und, je nach ihren Adsorptionseigenschaften, mit dem Klärschlamm in die Umwelt gelangten. Die Zufuhr von natürlichen Östrogenen erfolgt nach Meinung dieser Autoren über die natürlichen Exkretionsprozesse des Menschen. Der Mensch scheidet E2, Östriol und Östron bzw. ihre Konjugate (Sulfatester und Glucuronide) aus.

Die metabolische Inaktivierung des E2 erfolgt im Körper durch Einbau von Hydroxy- und Ketogruppen an verschiedene Ringpositionen und damit

zur Entstehung von Östron und Östriol, welches das Hauptabbauprodukt darstellt. Zusätzlich können nach Berechnungen, welche die produzierte Menge an EE zur Grundlage haben, EE-Konzentrationen im Auslaufwasser erwartet werden, die im ng / L-Bereich liegen. E2 und seine Metabolite Östron und Östriol sowie 17 α -Ethinylöstradiol besitzen eine biologische Aktivität, die gegenüber Industriechemikalien um ein Vielfaches erhöht ist. Eine hormonelle Wirkung des EE auf Regenbogenforellen wurde schon bei Konzentrationen von 0,3 ng / L beobachtet. Effekte im aquatischen System bei einem Wirkstoffgehalt von 0,1 ng / L werden nicht ausgeschlossen (TOFT & BAARTRUP 2001).

Weitere ED, die in Kläranlagenauslaufwasser gefunden wurden, waren Phthalat-Derivate. Es ergaben sich DEHP (Diethylhexylphthalat)-Konzentrationen in Kläranlagenausläufen von 1,5 – 81 μ g / L. Bei DBP (Dibutylphthalat) lagen die Konzentrationen bei 0,2 – 10,4 μ g / L. Die Autoren untersuchten ihre Gewässerextrakte im Hefetest und fanden in vier von sechs untersuchten Proben eine eindeutige östrogene Aktivität (TOFT & BAARTRUP 2001).

Schließlich spielt auch die Behandlung der den Kläranlagen zugeführten Abwässer eine Rolle für die Umweltbelastung mit ED. Endokrine Stoffe können sowohl durch kommunale als auch durch industrielle Abwässer in Kläranlagen gelangen. Sie kommen in der Regel in gelöster Form an und können teilweise in der mechanischen Reinigungsstufe durch Anlagerung an Feststoffe aus dem Abwasser entfernt und in den Klärschlamm überführt werden. Die dann noch im Abwasser gelösten Stoffe gelangen in die aerobe biologische Reinigung. Einige sind leicht metabolisierbar (Steroidhormone, Phytohormone), andere sind besonders langlebig. Zu letzteren zählen vor allem Xenoöstrogene. Die Adsorption an eine Belebtschlammflocke ist ebenso möglich wie eine Deglucuronierung der konjugierten Östrogene und damit eine Mobilisierung, denn die Glucuronidbindung kann mikrobiologisch sehr schnell gespalten werden (WENZEL ET AL. 1998). In Proben des Auslaufwassers verschiedener Kläranlagen wiesen KÖRNER ET AL. (2000) E2-Äquivalentkonzentrationen von 2,5 – 25 ng / L im Auslaufwasser nach, was mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten gut übereinstimmt.

KIRK ET AL. (2002) zeigten, dass die androgene und östrogene Aktivität geringer wurde, nachdem das Abwasser die Reinigungsstufen der Kläranlage durchlaufen hatte. Die höchste ED-Reduktionsrate wurde nach der zweiten (biologischen) Klärstufe erreicht. Die meisten Auslaufproben enthielten sehr wenig oder geringe östrogene und androgene Aktivität (max. 13 ng / L E2-Äquivalente bzw. max. 143 ng / L DHT-Äquivalente). Im Vergleich zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, die klar belegen, dass überwiegend östrogene, aber auch nicht zu vernachlässigende andere Wirkmecha-

nismen in Kläranlagenausläufen vorhanden sind und im Flussverlauf akkumulieren, erscheinen die bei oben genannter Studie angewandte Nachweismethode als weniger sensitiv.

4.4 VERGLEICH DER UNTERSUCHUNGEN VON EINZELSTOFF- UND GEMISCHANSATZ

Ein Vergleich zwischen Einzelstoff- und Gemischansatz führt zu der Aussage, dass beide Ansätze für bestimmte Fragestellungen Vorteile aufweisen. Letztlich ist es aber erforderlich, eine methodische Synthese zwischen den *in vitro*-Screeningmethoden und den *in vivo*-Expositionsversuchen zu erarbeiten. So können Ergebnisse aus *in vitro*-Experimenten mit Gewässerextrakten unvermeidlich nur begrenzte Informationen zur Aktivität der enthaltenen ED liefern. Sie können aber wertvolle Einsichten in die Störungsmechanismen geben. Allerdings müssen einzelne ED oder ED-Gemische ebenfalls *in vivo* getestet werden, um ein genaues Bild von der Wirkungsweise zu bekommen, besonders deswegen, weil viele Substanzen mehr als eine Art von Aktivität aufweisen können (SOHONI ET AL. 2001). Prinzipiell scheinen *in vitro*-Assays nicht sinnvoll zu sein, um Vorhersagen zur Gefährdung der Umwelt durch ED zu machen. Sie sollten aus diesem Grund nur dazu dienen, die Wirkmechanismen von ED aufzuklären und sie können mit Abstrichen dem schnellen Screening von potentiellen ED oder von Umweltproben dienen (SEGNER ET AL. 2003).

Eine bereits praktizierte Möglichkeit, wirksame Konzentrationen von ED in Gewässern zu untersuchen, stellen Experimente dar, bei denen in den Gewässern heimische Tiere in Käfigen in definierten Flussabschnitten den Belastungen ausgesetzt sind (sogenannte caging-Experimente). So wurden zum Beispiel in den Geweben von Fischen (*Catostomus commersoni*), die in Auslaufwasser von Papiermühlen gehalten wurden, Substanzen gefunden, die an den ER, AR und das SHBG binden konnten (HEWITT ET AL. 2000). Der Nachteil von caging-Experimenten besteht darin, dass Kontrolltiere benötigt werden, die nicht schon ED-adaptiert sind und somit eine belastete Kontrolle darstellen.

Weiterhin werden bei beiden vorgestellten Ansätzen zusätzliche Faktoren unberücksichtigt bleiben müssen, die auf die Reproduktionsbiologie einen Einfluss haben können. Bei Fischpopulationen wurde beispielsweise festgestellt, dass Habitatszerstörung, Klimaveränderungen, Nahrungsres-

sourcen, Konkurrenz, chemische Gifte, Prädatoren und ED gemeinsam auf die Reproduktionsbiologie Einfluss nehmen (VAN DER KRAAK ET AL. 2001).

Schließlich muss noch die Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf andere Amphibien bzw. andere Wirbeltiere diskutiert werden. *Xenopus laevis* lebt nicht in mitteleuropäischen Gewässersystemen. Es muss festgehalten werden, dass es eine nicht vernachlässigbare Übereinstimmung der Hormonsysteme von Amphibien und höheren Vertebraten bezüglich der Hormonnatur, der Rezeptoren, der intrazellulären Signalübertragungswege und der Regulation des Hormonsystems gibt. BÖGI ET AL. (2003) fanden heraus, dass grundsätzlich eine Korrelierbarkeit von Ergebnissen zwischen der freilebenden Art *Rana temporaria* und dem Modellorganismus *Xenopus laevis* in Bezug auf die Wirkungen von ED besteht.

Die vorgestellten Ergebnisse belegen, dass es prinzipiell möglich ist, mit einer Kombination aus chemischer Fraktionierung und Analytik sowie aus spezifischen Bioassays die Belastung von Gewässern mit ED zu charakterisieren. Das folgende Kapitel dient der Zusammenfassung der erzielten Erkenntnisse und betrachtet abschließend die zukünftigen Möglichkeiten, die sich aus dieser Arbeit ergeben werden.

4.5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Mit dem bekannten östrogen wirksamen ED BPA wurden sowohl Untersuchungen im Labor zur Bestimmung der biologischen Wirkung auf die Sexualdifferenzierung sowie auf die Induktion des östrogenen Biomarkers ER-mRNA bei Kaulquappen im sensiblen Stadium durchgeführt. So konnte eine Risikobewertung über *in vivo*-Ansätze ermöglicht werden. Parallel wurde hierzu die chemische Analytik für BPA etabliert, um die tatsächlich vorhandenen BPA-Konzentrationen in Labor- und Freiland-Proben zu bestimmen. Es zeigte sich, dass BPA in Gewässerextrakten der Alb in Konzentrationen vorhanden ist, die ca. zwei Größenordnungen unterhalb einer östrogenen Wirkung liegen. Nach dem Vorsorgeprinzip gelten diese Werte als bedenklich. Da es sich hier nur um eine Einzelsubstanz handelt und ergänzende chemische Analysen belegten, dass daneben noch weitere ED wie z.B. EE teilweise in biologisch wirksamen Mengen vorhanden sind und auch Phytoöstrogene wie Coumestrol und β -Sitosterol sowie o,p'-DDE in gut messbaren Quantitäten die Alb belasten, muss davon ausgegangen werden, dass die Umweltbelastung der Alb durch die Gesamtheit an ED biologische Wirkungen induzieren kann.

Zur Bestimmung der möglichen Wirkmechanismen ((anti)östrogen und (anti)androgen) in Extrakten der Alb wurden konventionelle Rezeptorbindungsstudien für den Nachweis der Bindung an AR und ER eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass neben den erwarteten hohen Werten für Interaktionen mit dem ER unerwartet deutlich auch Inhaltsstoffe vorhanden sind, die an den AR binden und somit potenziell (anti)androgene ED anzeigen. Parallel wurden dieselben Proben-Extrakte auch auf ihre Fähigkeit untersucht, in Primärzellkulturen Biomarker zu induzieren. Um Aussagen über die Wirkmechanismen zu erhalten, wurde zum einen der rein östrogene Biomarker ER-mRNA angewendet und zum anderen RBP-mRNA als neuer Biomarker, der sowohl (ant)östrogene als auch (anti)androgene Wirkmechanismen detektieren und somit als summarischer Biomarker für alle vier Wirkmechanismen angesehen werden kann, etabliert und bestimmt. Der Nachweis beider Biomarker, ER- und RBP-mRNA, um die biologische Wirkung der Alb-Extrakte in Primärzellkulturen zu ermitteln, ergab im Vergleich mit den Ergebnissen der Radiorezeptorassays, dass in der Alb überwiegend östrogenartige ED vorhanden sind, die vor allem über die Kläranlagenausläufe eingeleitet werden. Im Vergleich mit den Resultaten des rein östrogenen Biomarkers ER-mRNA, die eine relativ hohe östrogene Potenz der Gewässerbelastung anzeigen, ergeben die Werte für den summarischen Biomarker RBP-mRNA ein deutlich geringeres östrogenes Potenzial, was darauf schließen lässt, dass neben den östrogenen auch androgene bzw. antiöstrogene Wirkmechanismen in nennenswertem Umfang vorhanden sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen belegen anhand der Kombination von chemischer Analytik und verschiedener spezifischer Bioassays, dass in durchschnittlich anthropogen belasteten Oberflächengewässern wie der Alb ED mit verschiedenen Wirkmechanismen in nennenswertem Umfang vorhanden sind, so dass biologische Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie von Wirbeltieren auftreten können. Besonders interessant erscheint die Tatsache, dass, wie am Vergleich des rein östrogenen Biomarkers ER-mRNA und des summarischen Biomarkers RBP-mRNA zu sehen ist, die östrogenen Hauptwirkungen durch antagonistische androgene Wirkmechanismen wieder reduziert werden, so dass die Summe aus antagonistischen biologischen Wirkungen auf die Tierwelt geringer ausfallen dürfte als die Detektion der spezifischen Wirkmechanismen jeweils alleine erwarten ließe. Ob diese Hypothese, dass sich die Wirkungen von ED mit verschiedenen Wirkmechanismen tatsächlich aufheben oder aufsummieren, verifiziert werden kann und inwieweit dies geschieht, ist Gegenstand laufender und künftiger Untersuchungen.

Eine Weiterentwicklung des Testsystems zur Untersuchung der Gewässerbelastung mit ED sollte die Etablierung weiterer wirkungsspezifischer Biomarker für die potenziellen reproduktionsrelevanten Wirkmechanismen beinhalten. Zusätzlich muss über die Entwicklung von Reprotergenassays die Möglichkeit geschaffen werden, das Transaktivierungspotenzial von ED zu erfassen und zu bestimmen. Diese in unserem Labor zur Zeit stattfindenden Bemühungen werden durch die Weiterentwicklung der chemischen Fraktionierungs- und Analysemethoden unterstützt, so dass die durch diese Arbeit gezeigten Möglichkeiten, mit dem Amphibienmodell *Xenopus laevis* Untersuchungen zur Gewässerbelastung mit ED durchzuführen, optimiert und erweitert werden.

5 LITERATUR

- BAARTRUP E, JUNGE M (2001): Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*), Environ. Health Persp. **109**, 1063-1070
- BEN-JONATHAN N, STEINMETZ R (1998). Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A, Trends Endocrinol. Metab. **9**, 124-128
- BERGERON RM, THOMPSON TB, LEONARD LS, PLUTA L, GAIDO KW (1999): Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line, Mol. Cell. Endocrinol. **150**, 179-187
- BLAUSTEIN AR, HOFFMANN PD, HOKIT DG, KIESECKER JF, WALLS SC, HAYS JB (1994): UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines?, Proc. Nat. Acad. Sci. **91**, 1791-1795
- BLAUSTEIN A, WAKE D (1990): Declining amphibian population, Trend. Ecol. Evol. **5**, 203-204
- BÖGI C, SCHWAIGER J, FERLING H, MALLOW U, STEINECK C, SINOWATZ F, KALBFUS W, NEGELE RD, LUTZ I, KLOAS W (2003): Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*, Environ. Res. **93**, 195-201
- BÖGI C, LEVY G, LUTZ I, KLOAS W (2002): Functional genomics and sexual differentiation in amphibians, Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. **133**, 559-570
- BRIDGES CM (2000). Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*), Arch. Environ. Contam. Toxicol. **39**, 91-96
- BURNISON BK, HODSON PV, NUTTLEY DJ, EFLER S (1996): A bleached-kraft mill effluent fraction causing induction of a fish mixed-function oxygenase (MFO) enzyme, Environ. Toxicol. Chem. **15**, 1524-1531.
- BYRNE BC, LI JJ, SNINSKY J, POIESZ BJ (1988): Detection of HIV-1 RNA sequences by *in vitro* DNA amplification, Nucleic Acids Res. **16**, 4165-4170
- CALABRESE ED (2001): Estrogen and related compounds: biphasic dose responses, Crit. Rev. Toxicol. **31**, 503-515
- CAREY C, HEYER WR, WILKINSON J, ALFORD RA, ARNTZEN JW, HALLIDAY T, HUNGERFORD L, LIPS KR, MIDDLETON EM, ORCHARD SA, RAND AS (2001): Amphibian declines and environmental change: Use of remote-sensing data to identify environmental correlates, Conserv. Biol. **15**, 903-913

- CAREY C (2000): Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations with comments on emerging in coral reef organisms and in humans, *Environ. Health Perspect.* **108**, 143-149
- CAREY C, BRYANT C (1995): Possible interactions among environmental toxicants, amphibian development and decline of amphibian populations, *Environ. Health Perspect.* **103**, 13-17
- COLBORN T, DUMANOWSKI D, MYERS JP (1996): "Our Stolen Future." Little Brown & Co., London
- COLBORN T, VOM SAAL FS, SOTO AM (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.* **101**, 378-384
- COLBORN T, CLEMENT C (1992): Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection, Princeton Scientific Publishing, Princeton
- CORTHÉSY B, CLARET FX, WAHLI W (1990): Estrogen receptor level determines sex-specific *in vitro* transcription from the *Xenopus* vitellogenin promotor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 7878-7882
- DE GUISE S, MARTINEAU D, BELAND P, FOURNIER M (1995): Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*), *Eviron. Health Perspect.* **103**, 73-77
- DEUCHAR E (1975): *Xenopus* – The South african clawed frog, John Wiley & Sons, London
- DÖHLER KD, NEW MI (1989): Sexualentwicklung, in: Endokrinologie (HESCH RD, Ed.), pp. 501-512, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- DODDS EC, LAWSON W (1936): Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus, *Nature* **137**, 996
- DORN PB, CHOU CS, GENTEMPO JJ (1987): Degradation of bisphenol A in natural waters, *Chemosphere* **16**, 1501-1507
- DOSCH R, GAWANTKA V, DELIUS H, BLUMENSTOCK C, NIEHRS C (1997): Bmp4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*, *Development* **124**, 2325-2334
- DOSTAL D, ROTHBLUM K, BAHU K (1994): An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* **223**, 239-250
- EULING SY, KIMMEL CA (2001): Developmental stage sensitivity and mode of action information for androgen agonists and antagonists, *Sci. Total Environ.* **274**, 103-113

- EUROPEAN COMMISSION (1996): European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife, Weybridge, 2-4 Dec. 1996, Report Eur 17549, Environment and Climate Research Programme, DG XII, European Commission
- FIELDEN MR, ZACHAREWSKI TR (2001): Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology, *Toxicol. Sci.* **60**, 6-10
- FLOWER DR (1996): The lipocalin protein family: Structure and function, *Biochem. J.* **318**, 1-14
- FOX GA (2001): Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence basin, *Environ. Health Perspect.* **109**, 853-861
- FÜRHACKER M, SCHARF S, WEBER H (2000): Bisphenol A: emissions from point sources, *Chemosphere* **41**, 751-756
- FUNK W, DAMMANN V, DONNEVERT G (1992): Qualitätssicherung der Analytischen Chemie, VCH, Weinheim
- FUNKENSTEIN B (2001): Developmental expression, tissue distribution and hormonal regulation of fish (*Sparus aurata*) serum retinol-binding protein, *Comp. Biochem. Physiol. B* **129**, 613-622
- GAGNÉ F, BLAISE C, SALAZAR M, SALAZAR S, HANSEN PD (2001): Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*, *Comp. Biochem. Physiol. C – Toxicol. Pharmacol.* **128**, 213-225
- GALLIEN L (1974): Intersexuality, in: *Physiology of the amphibia* (B. Lofts, Ed.), Vol 2, 523-549, Academic Press, New York
- GRAF JD (1989a): Genetic mapping in *Xenopus laevis*: eight linkage groups established, *Genetics* **123**, 389-398
- GRAF JD (1989b): Sex linkage of malic enzyme in *Xenopus laevis*, *Experientia* **45**, 194-196
- GRAY MA, METCALFE CD (1997): Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol, *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1082-1086
- GUNDERSON MP, LEBLANC GA, GUILLETTE LJ JR. (2001): Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes, *Environ. Health Perspect.* **109**, 1257-1264
- HANSEN PD (1997): Ecotoxicology and landscape planning, *Qual. Assur.* **5**, 231-241

- HARRIS HA, BAPAT AR, GONDER DS, FRAIL DE (2002): The ligand binding profiles of estrogen receptors alpha and beta are species dependent, *Steroids* **67**, 379-384
- HAYES TB, COLLINS A, LEE M, MENDOZA M, NORIEGA N, STUART AA, VONK A (2002): Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5476-5480
- HAYES TB (1998): Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms, *J. Experiment. Zool.* **281**, 373-399
- HECKER M, TYLER CR, HOFFMANN M, MADDIX S, KARBE L (2002): Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany, *Environ. Sci. Technol.* **36**, 2311-2321
- HEEMKEN OP, REINCKE H, STACHEL B, THEOBALD N (2001): The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea, *Chemosphere* **45**, 245-259
- HEWITT LM, PARROTT JL, WELLS KL, CALP MK, BIDDISCOMBE S, MCMASTER ME, MUNKITTRICK KR, VAN DER KRAAK GJ (2000): Characteristics of ligands for the Ah receptor and sex steroid receptors in hepatic tissues of fish exposed to bleached kraft mill effluent, *Environ. Sci. Technol.* **34**, 4327-4334
- HILKEN G, DIMIGEN J, IGLAUER F (1995): Growth of *Xenopus laevis* under different laboratory rearing conditions, *Laboratory Animals* **29**, 152-162
- HIORT O, HOLTERHUS PM (2000): The molecular basis of male sexual differentiation, *Eur. J. Endocrinol.* **142**, 101-110
- HU JY, AIZAWA T, OOKUBO S (2002): Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity, *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1980-1987
- HUBER SA, BALZ A, FRIMMEL FH (1994): Identification of diffuse and point sources of dissolve organic carbon (DOC) in a small stream (Alb, Southwest Germany), using gel filtration chromatography with high-sensitivity DOC-detection, *Fres. J. Anal. Chem.* **350**, 496-503
- JOBLING S, NOLAN M, TYLER CR, BRIGHTY G, SUMPTER JP (1998): Widespread sexual disruption in wild fish, *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2498-2506
- JOBLING S, SUMPTER J (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquatic Toxicol.* **27**, 361-372
- KELCE WR, WILSON EM (1997): Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J. Mol. Med.* **75**, 198-207

- KELCE WR, MONOSSON E, GAMCSIK MP, LAWS SC, GRAY LE JR. (1994): Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126**, 276-85
- KELLEY DB (1996): Sexual differentiation in *Xenopus laevis*, in: *The biology of Xenopus* (TINSLEY RC, KOBEL HR, Eds.), pp. 143-193, Clarendon Press, Oxford
- KIME D (1998): *Endocrine disruption in fish*, Kluwer Academic Publishers, Boston-Dordrecht-London
- KIRK LA, TYLER CR, LYE CM, SUMPTER JP (2002): Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works, *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 972-979
- KLECKA GM, GONSIOR SJ, WEST RJ, GOODWIN PA, MARKHAM DA (2001): Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments: River die-away, *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2725-2735
- KLOAS W (2002): Amphibians as a model to study endocrine disruptors, *Int. Rev. Cytol.* **216**, 1-57
- KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, ENGELS B, LUTZ I (2000): Amphibians as a model to study endocrine disruptors: an additional risk of environmental pollution in aquatic ecosystems?, *Berichte des IGB* **10**, 131-140
- KLOAS W, EINSPANIER R, LUTZ I (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors II: Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*, *Sci. Total Environ.* **225**, 59-68
- KÖRNER W, BOLZ U, TRIEBSKORN R, SCHWAIGER J, NEGELE RD, MARX A, HAGENMAIER H (2001): Steroid analysis and xenosteroid potentials in two small streams in southwest Germany, *J. Aquatic Eco. Stress Recov.* **8**, 215-229
- KÖRNER W, BOLZ U, SUSSMUTH W, HILLER G, SCHULLER W, HANF V, HAGENMAIER H (2000): Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany, *Chemosphere* **40**, 1131-1142
- KOLPIN DW, FURLONG ET, MEYER MT, THURMAN EM, ZAUGG SD, BARBER LB, BUXTON HT (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1202-1211
- KRUSKAL WH, WALLIS WA (1952): Use of ranks in one-criterion variance analysis, *J. Amer. Stat. Ass.* **47**, 583-621
- LEVY G, LUTZ I, KRÜGER A, KLOAS W (2004a): Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles, *Environ. Res.* **94**, 102-111

- LEVY G, LUTZ I, KRÜGER A, VON TÜMPLING W, KLOAS W (2004b): Retinol-binding protein as a biomarker to assess endocrine-disrupting compounds in the environment, *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 676-683
- LFU (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 1997): Beschaffenheit der Fließgewässer, Jahreskatalog 1997. Oberirdische Gewässer und Gewässerökologie, Band 50
- LFU (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 1982): Wasserpflanzen als Belastungsindikatoren in Fließgewässern, dargestellt am Beispiel der Schwarzwaldflüsse Nagold und Alb, *Beih. Veröff. Naturschutz u. Landschaftspflege Bad.-Württ.* **28**, 1-118
- LINDHOLST C, PEDERSEN KL, PEDERSEN SN (2000): Estrogenic response of bisphenol A in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat. Toxicol.* **48**, 87-94
- LUTZ I (1999): *Xenopus laevis* als Studienmodell zum Nachweis östrogenen Wirkungen von Umweltchemikalien, Dissertation Universität Karlsruhe (TH)
- LUTZ I, KLOAS W (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors I: Environmental pollution and estrogen receptor binding, *Sci. Total. Environ.* **225**, 49-57
- MAY FEB, KNOWLAND J (1981): Patterns of protein synthesis in livers of *Xenopus laevis* during metamorphosis: effects of estrogen in normal and thyrostatic animals, *Develop. Biol.* **82**, 158-167
- McKEARIN DM, SHAPIRO DJ (1988): Persistent estrogen induction of hepatic *Xenopus laevis* serum retinol binding protein mRNA, *J. Biol. Chem.* **263**, 3261-3265
- McKEARIN DM, BARTON MC, KELLER MJ, SHAPIRO DJ (1987): Estrogens induce transcription of the *Xenopus laevis* serum retinol binding protein gene, *J. Biol. Chem.* **11**, 4939-4942
- MIYATA S, KOIKE S, KUBO T (1999): Hormonal reversal and the genetic control of sex differentiation in *Xenopus*, *Zool. Sci.* **15**, 335-340
- MÜLLER MB, FRIMMEL FH (2002): A new concept for the fractionation of DOM as a basis for its combined chemical and biological characterization, *Water Res.* **36**, 2643-2655
- NIEUWKOOP PD, FABER J (1994): Normal table of *Xenopus laevis* Daudin, North-Holland, Amsterdam
- NORRIS DO (1997): *Vertebrate Endocrinology*, Academic Press, San Diego
- OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, TILLMANN M, MARKERT B (2000): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens, *Ecotoxicology* **9**, 383-397

- OPITZ R, LEVY G, BÖGI C, LUTZ I, KLOAS W (2002): Endocrine disruption in fish and amphibians, *Recent Res. Devel. Endocrinol.* **3**, 127-170.
- OSTBY J, KELCE WR, LAMBRIGHT C, WOLF CJ, MANN P, GRAY LE JR. (1999): The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*, *Toxicol. Ind. Health* **15**, 80-93
- PICKFORD DB, HETHERIDGE MJ, CAUNTER JE, HALL AT, HUTCHINSON TH (2003): Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system, *Chemosphere* **53**, 223-235
- PURDOM C, HARDIMAN P, BYE V, ENO N, TYLER C, SUMPTER J (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works, *Chem. Ecol.* **8**, 275-285
- RABELO EM, TATA JR (1993): Thyroid hormone potentiates estrogen activation of vitellogenin genes and autoinduction of estrogen receptor in adult *Xenopus* hepatocytes, *Mol. Cell. Endocrinol.* **96**, 37-44
- SANDERSON JT, BOERMA J, LANSBERGEN GW, VAN DEN BERG M (2002): Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**, 44-54
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Sci.* **74**, 5463-5467
- SCHÄFER M (1999): Regionalisierte Stoffstrombilanzen in städtischen Einzugsgebieten – Möglichkeiten, Probleme und Schlussfolgerungen, Dissertation Universität Karlsruhe (TH)
- SEGNER H, NAVAS JM, SCHAFERS C, WENZEL A (2003): Potencies of estrogenic compounds in *in vitro* screening assays and in life cycle tests with zebrafish *in vivo*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **54**, 315-322
- SHEEHAN DM (2000): Activity of environmentally relevant low doses of endocrine disruptors and the bisphenol A controversy: initial results confirmed, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **224**, 57-60
- SOHONI P, LEFEVRE PA, ASHBY J, SUMPTER JP (2001): Possible androgenic / anti-androgenic activity of the insecticide fenitrothion, *J. Appl. Toxicol.* **21**, 173-178
- SONNENSCHN C, SOTO AM (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **65**, 143-150
- SNYDER ST, KEITH TL, VERBRUGGE DA, SNYDER EM, GROSS TS, KANNAN K, GIESY JP (1999): Analytical Methods for Detection of Selected Estro-

- genic Compounds in Aqueous Mixtures – Environ. Sci. Technol. **33**, 2814-2820
- SOHONI P, TYLER CR, HURD K, CAUNTER J, HETHERIDGE M, WILLIAMS T, WOODS C, EVANS M, TOY R, GARGAS M, SUMPTER JP (2001): Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), Environ. Sci. Technol. **35**, 2917-2925
- SPERRY TS, THOMAS P (1999): Characterization of two nuclear androgen receptors in Atlantic croaker: Comparison of their biochemical properties and binding specificities, Endocrinology **140**, 1602-1611
- STAPLES CA, DORN PB, KLECKA GM, O'BLOCK ST, HARRIS LR (1998): A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, Chemosphere **36**, 2149-2173
- STEINBERG CEW, PAUL A, PFLUGMACHER S, MEINELT T, KLOCKING R, WIEGAND C (2003): Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals - A review, Fres. Environ. Bull. **12**, 391-401
- STONE CM, WATKINSON RJ (1983): Diphenylol propane: An assessment of ready biodegradability, Report SBGR.83.425, Sittingbourne Research Centre, Kent, England
- SUMPTER JP (1997): Environmental control of fish reproduction: a different perspective, Fish Physiol. Biochem. **17**, 25-31
- TENNISWOOD MP, SEARLE PF, WOLFFE AP, TATA JR (1983): Rapid estrogen metabolism and vitellogenin gene expression in *Xenopus* hepatocyte cultures, Mol. Cell: Endocrinol. **30**, 329-345
- TOFT G, BAATRUP E (2001): Sexual characteristics are altered by 4-tert-octylphenol and 17 beta-estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*), Ecotoxicology and Environmental Safety **48**, 76-84
- TYLER CR, JOBLING S, SUMPTER JP (1998): Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence, Crit. Rev. Toxicol. **28**, 319-361
- VAN DER KRAAK G, HEWITT M, LISTER A, MCMASTER ME, MUNKITTRICK KR (2001): Endocrine toxicants and reproductive success in fish, Human and Ecological Risk Assessment **7**, 1017-1025
- VAN DER WAERDEN BL (1969): Mathematical Statistics, Springer Verlag, New York
- VARRIALE B, TATA JR (1990): Autoinduction of estrogen receptor is associated with FOSP-1 mRNA induction by estrogen in primary cultures of *Xenopus* oviduct cells, Mol. Cell. Endocrinol. **71**, R25-R31
- VOS J, DYBING E, GREIM H, LADEFOGED O, LAMBRÉ C, TARAZONA J, BRANDT I, VETHAACK A (2000): Health effects of endocrine-disruption chemicals on wildlife, with special reference to the European situation, Crit. Rev. Toxicol. **30**, 71-133

- WALLACE H, BADAWY G, WALLACE B (1999): Amphibian sex determination and sex reversal, *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 901-909
- WANG AM, DOYLE MV, MARK DF (1989): Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 9717-9721
- WEBER E (1986): *Grundriss der biologischen Statistik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- WEILER I, LEW D, SHAPIRO D (1987): The *Xenopus laevis* estrogen receptor: Sequence homology with human and avian receptors and identification of multiple estrogen receptor messenger ribonucleic acids, *Mol. Endocrinol.* **1**, 355-362
- WELSHONS WV, NAGEL SC, THAYER KA, JUDY BM, VOM SAAL FS (1999): Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increase adult prostate size in mice, *Toxicol. Ind. Health* **15**, 12-25
- WENZEL A, KÖCHLER T, HENSCHKE KP, SCHNAAK W, DIEDRICH M, MÖLLER J (1998): Konzentrationen östrogen wirkender Substanzen in Umweltmedien, Umweltbundesamt 216 02 011/11, 1-88
- WEST RJ, GOODWIN PA, KLECKA GM (2001): Assessment of the ready biodegradability of bisphenol A, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **67**, 106-112
- WHITTEN PL, PATISAUL HB (2001): Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action, *Environ. Health Perspect.* **109**, 5-20
- WIJAYARATNE AL, NAGEL SC, PAIGE LA, CHRISTENSEN DJ, NORRIS JD, FOWLKES DM, McDONNELL DP (1999): Comparative analyses of mechanistic differences among antiestrogens, *Endocrinology* **140**, 5828-5840
- WITSCHI E, ALLISON J (1950): Responses of *Xenopus* and *Alytes* to the administration of some steroid hormones, *Anat. Rec.* **108**, 589-590
- WITSCHI E (1971): Mechanisms of sexual differentiation, in: *Hormones in Development* (HAMBURG M, BARRINGTON E, Eds.), pp. 601-618, Appleton Century Crofts, New York
- YAMASAKI K, SAWAKI M, NODA S, IMATANAKA N, TAKATSUKI M (2002): Subacute oral toxicity study of ethynylestradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407", *Arch. Toxicol.* **76**, 65-74
- YOKOTA H, TSURUDA Y, MAEDA M, OSHIMA Y, TADOKORO H, NAKAZONO A, HONJO T, KOBAYASHI K (2000): Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 1925-1930

6 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei

Prof. Dr. Werner Kloas,
Prof. Dr. Andreas Elepfandt,
Prof. Dr. Jörg Oehlmann,

bei den Mitarbeitern der Abteilung Binnenfischerei des Instituts für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin, vor allem bei Dr. Ilka Lutz, Dr. Christian Bögi, Robert Opitz, Sven Würtz, Wibke Schumacher, Antje Tilkack und Doris Thoms,

bei Angela Krüger und Antje Lüder, Mitarbeiterinnen des Chemielabors des Instituts für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin,

bei den verantwortlichen Mitarbeitern der Kläranlagen Neureut und Neurod sowie bei Margit Müller vom Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, der Universität Karlsruhe

und schließlich bei meiner Familie und Tatjana.

Es war eine tolle Zeit, die mir viel Spaß bereitet hat. Hilfestellungen, Anregungen und Motivation zugleich erhielt ich durch die ausführlichen fachlichen und persönlichen Gespräche und Kontakte. Nur durch die vielfältige Unterstützung der genannten Personen konnte diese Arbeit gelingen. Vielen Dank!

ANHANG

LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN

- Begutachtete Veröffentlichungen:

LEVY G, LUTZ I, KRÜGER A, KLOAS W (2004): Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles, Environ. Res. **94**, 102-111

LEVY G, LUTZ I, KRÜGER A, VON TÜMLING W, KLOAS W (2004): Retinol-binding protein as a biomarker to assess endocrine-disrupting compounds in the environment, Anal. Bioanal. Chem. **378**, 676-683

BÖGI C, LEVY G, LUTZ I, KLOAS W (2002): Functional genomics and sexual differentiation in amphibians, Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. **133**, 559-570

- Weitere Veröffentlichungen:

KLOAS W, LEVY G, BÖGI C, OPITZ R, LUTZ I (2002): Effects of environmental chemicals on reproductive biology of amphibians. Proceedings of 2nd Status Seminar Endocrine Disrupters 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany, <http://www.status-umwelthormone.de>, 55-58

KLOAS W, LEVY G, OPITZ R, BÖGI C, WÜRTZ S, OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, VAN BALLEGOY C, URBATZKA R, JAGNYTSCH O, LUTZ I (2003): Wirkungen endokrin wirksamer Substanzen auf aquatische Tiere. In : Hormonell wirksame Stoffe und Pharmaka in Gewässern 40. Tutzing-Symposium. VCH-Wiley

KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I (2002): Sexual differentiation in amphibians. Proceedings of the 21st Conference of the European Comparative Endocrinologists (Bonn, Germany, 26-30 August, 2002), Monduzzi Editore

LEVY G, LUTZ I, KRÜGER A, CATO A, KLOAS W (2002): Identifizierung der Gewässerbelastung durch endokrin wirksame Substanzen (endocrine disruptors) sowie deren Risikobewertung für die Reproduktionsbiologie – Amphibien als Indikator für Ökosysteme, <http://www.bwplus.fzk.de/kloas.pdf>, 1-12

LEVY G, BÖGI C, LUTZ I, OPITZ R, KLOAS W (2002): Amphibians as model to study endocrine disruptors: I. *In vivo* effects on reproductive biology. Proceedings of 2nd Status-Seminar Endocrine Disrupters 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany, <http://www.status-umwelthormone.de>, 99-102

- LEVY G, LUTZ I, OPITZ R, KRÜGER A, KLOAS W (2002): Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles via estrogen-response systems. Proceedings of the 21st Conference of the European Comparative Endocrinologists (Bonn, Germany, 26-30 August, 2002), Monduzzi Editore, 91-94
- LUTZ I, SCHULZ A, LEVY G, BÖGI C, OPITZ R, WÜRTZ S, KLOAS W (2002): Establishment of estrogenreceptor-mRNA as estrogenic biomarker in the amphibian *Rana temporaria*. Proceedings of the 21st Conference of the European Comparative Endocrinologists (Bonn, Germany, 26-30 August, 2002), Monduzzi Editore
- OPITZ R, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I, KLOAS W (2002): Development of a *Xenopus* metamorphosis assay (XEMA) to detect thyroid-disrupting activity of environmental chemicals. Berichte des IGB **13**, <http://www.igb-berlin.de>
- OPITZ R, LEVY G, BÖGI C, LUTZ I, KLOAS W (2002): Endocrine disruption in fish and amphibians, Recent Res. Devel. Endocrinol. **3**, 127-170
- OPITZ R, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I, KLOAS W (2002): Amphibians as model to study endocrine disruptors: II. Bioassay development for detection of chemicals affecting thyroid system in *Xenopus laevis* tadpoles. Proceedings of 2nd Status-Seminar Endocrine Disruptors 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany, <http://www.status-umwelthormone.de>, 217-220
- OPITZ R, LEVY G, LUTZ I, KLOAS W (2002): Development of molecular biomarkers to detect thyroid-disrupting activities of environmental chemicals in *Xenopus laevis* tadpoles. Proceedings of the 21st Conference of the European Comparative Endocrinologists (Bonn, Germany, 26-30 August, 2002), Monduzzi Editore, 99-102
- KLOAS W, LEVY G, BÖGI C, LUTZ I (2001): Welchen Einfluß haben Umweltchemikalien durch endokrine Effekte auf die Reproduktion? – Amphibien als Indikator für Ökosysteme. Zwischenbericht zu BWB 99001 der Projektträgerschaft: Baden-Württemberg, Programm Lebensgrundlage, Umwelt und ihre Sicherung (BW-PLUS), web-page: <http://bwplus.fzk.de/kloas.pdf>, 1-15
- KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, ENGELS B, LUTZ I (2000): Welchen Einfluß haben Umweltchemikalien durch endokrine Effekte auf die Reproduktion? – Amphibien als Indikator für Ökosysteme. Statusseminar der Projektträgerschaft: Baden-Württemberg, Programm Lebensgrundlage, Umwelt und ihre Sicherung (BW-PLUS), web-page: <http://bwplus.fzk.de/kloas.pdf>, 1-11
- KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, ENGELS B, LUTZ I (2000): Amphibians as a model to study endocrine disruptors: An additional risk of environmental pollution in aquatic ecosystems? Berichte des IGB **10**, 131-140

- Abstracts / Poster:

KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I (2002): Sexual differentiation in amphibians. Proceedings of the International Conference of the European Society for Comparative Endocrinology, Bonn, Germany, 26th-30th August, 2002

LUTZ I, SCHULZ A, LEVY G, BÖGI C, OPITZ R, WÜRTZ S, KLOAS W (2002): Establishment of estrogenreceptor-mRNA as estrogenic biomarker in the amphibian *Rana temporaria*. Proceedings of the International Conference of the European Society for Comparative Endocrinology, Bonn, Germany, 26th-30th August, 2002

KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I (2001): Welchen Einfluß haben Umweltchemikalien durch endokrine Effekte auf die Reproduktion? – Amphibien als Indikator für Ökosysteme. Statusseminar der Projektträgerschaft: Baden-Württemberg, Programm Lebensgrundlage, Umwelt und ihre Sicherung (BW-PLUS). (Abstract, oral communication)

KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, OPITZ R, LUTZ I (2001): Are endocrine disruptors a threat for aquatic ecosystems – amphibians as model. Proceedings of the Meeting of the Gesellschaft für Ökologie held at Basel, August 27th-31st, 2001. (Abstract, invited lecture, 173

KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, OPITZ R, LUTZ I (2001): Amphibians as model to study endocrine disruptors. Proceedings of the International Symposium on Endocrinology and Neurobiology of Amphibians and Reptiles, Camerino, Italy, 1st-3rd June, 2001, 36 (Abstract, oral communication)

KLOAS W, LEVY G, BÖGI C, OPITZ R, LUTZ I (2001): Effects of environmental chemicals on reproductive biology of amphibians. Proceedings of 2nd Status-Seminar Endocrine Disrupters 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany, 67. (Abstract, oral communication)

LEVY G, BÖGI C, LUTZ I, OPITZ R, KLOAS W (2001): Amphibians as model to study endocrine disruptors: I. *In vivo* effects on reproductive biology. Proceedings of 2nd Status-Seminar Endocrine Disrupters 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany, 95. (Abstract)

LEVY G, BÖGI C, LUTZ I, OPITZ R, KLOAS W (2001): In vivo effects of endocrine disruptors on reproductive biology of *Xenopus laevis*. Proceedings of the International Symposium on Endocrinology and Neurobiology of Amphibians and Reptiles, Camerino, Italy, 1st-3rd June, 2001, 56. (Abstract)

OPITZ R, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I, KLOAS W (2001): Amphibians as model to study endocrine disruptors: II. Bioassay development for detection of chemicals affecting thyroid system in *Xenopus laevis* tadpoles. Proceedings of 2nd Status-Seminar Endocrine Disrupters 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany, 111. (Abstract)

- OPITZ R, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I, KLOAS W (2001): Validation of a bioassay (XEMA) for detection of chemicals affecting thyroid system in *Xenopus laevis*. Proceedings of the International Symposium on Endocrinology and Neurobiology of Amphibians and Reptiles, Camerino, Italy, 1st-3rd June, 2001, 67. (Abstract)
- KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I (2000): Welchen Einfluß haben Umweltchemikalien durch endokrine Effekte auf die Reproduktion? – Amphibien als Indikator für Ökosysteme. Statusseminar der Projektträgerschaft: Baden-Württemberg, Programm Lebensgrundlage, Umwelt und ihre Sicherung (BW-PLUS). (Abstract, oral communication)
- KLOAS W, BÖGI C, LEVY G, LUTZ I (2000): Amphibians as model to study endocrine disruptors. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 92.1, 87 (Abstract, oral communication)
- KLOAS W, LEVY G, BÖGI C, LUTZ I (2000): *In vitro* and *in vivo* effects of bisphenol A on the amphibian *Xenopus laevis*. Proceedings of the International Workshop: Bisphenol A: Low Dose Effects – High Dose Effects, Berlin 18th-20th November 2000. (Abstract, oral communication)
- LEVY G, BÖGI C, LUTZ I, KLOAS W (2000): *In vivo* effects of endocrine disruptors on sexual differentiation and biomarkers in the amphibian *Xenopus laevis*. Proceedings of the International Workshop: Bisphenol A: Low Dose Effects – High Dose Effects, Berlin 18th-20th November 2000. (Abstract)
- LEVY G, BÖGI C, KLOAS W (1999): *In vivo* effects of endocrine disruptors on sexual differentiation and biomarkers in the amphibian *Xenopus laevis*. Proceedings of the 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, Leipzig, 25-29 May 1999. (Abstract)

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.